



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

**Efectes sobre l'audició i l'equilibri  
de la co-exposició al soroll ric en baixes freqüències  
i el disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>)**

Maria Carreres Pons



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# **Efectes sobre l'audició i l'equilibri de la co-exposició al soroll ric en baixes freqüències i el disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>)**

Tesi doctoral presentada per  
**Maria Carreres Pons**





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Memòria presentada per **Maria Carreres Pons** per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

### **Programa de doctorat en Biomedicina**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la co-direcció del Dr. Pierre Campo, al laboratori d'Ototoxicitat i Neurotoxicitat del departament de Toxicologia i Biometrologia de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS, Nancy, France) i del Dr. Jordi Llorens i Baucells de la Unitat de Fisiologia del Departament de Ciències Fisiològiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge).

**Els directors de la tesi,**

**La doctorand,**

**Jordi Llorens Baucells**

Professor Catedràtic

Dept. Ciències Fisiològiques II

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

**Pierre Campo**

Director de recerca

Dept. Toxicologia i Biometrologia

Institut National de Recherche et

de Sécurité (INRS), Nancy.

**Maria Carreres Pons**

Nancy, 2018





**Aquest treball de tesi ha estat finançat per l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des maladies professionnelles et des accidents du travail (INRS, France).**



*Als meus pares, Josep i Rosa,  
per mostrar-me que tot esforç té la seva recompensa,  
sempre sereu un model a seguir.*



## AGRAÏMENTS

Fa uns anys no se m'hagués ni passat pel cap tenir entre les mans la meva pròpia tesi. Després d'aquella conversa; *“Que me’n dius d’anar a fer un doctorat a Nancy?”* *“A Nancy, on és açò?”* *“A França”* *“Nooo, si no sé francès i, a més, jo un doctorat?”*, aquí estic.

Em vaig trobar, fa més de 3 anys, agafant de nou les maletes per emprendre una altra aventura, aquesta vegada encara una mica més lluny de casa, canviant el blau del mar pel gris del cel, i demanant-me si havia pres la decisió correcta. I la realitat és que tots aquests anys han estat plens de grans moments i experiències que m’han fet créixer i m’han mostrat a conèixer-me tant personalment com professionalment. Per jo, la tesi ha estat molt més que un treball d’investigació. Ha estat una prova de superació personal, una etapa de la meua vida molt important en que he pogut reflexionar sobre moltes coses, i no només de ciència.

*Petit à petit*, i encara que sembli impossible, he arribat fins aquí, no sense l’ajuda de moltes persones indispensables en aquest camí. Per això, fent una ullada de nou per tot aquest recorregut, i sense voler oblidar-me de ningú, és el moment d’agrair-vos tot el suport rebut.

Primer de tot agrair als meus directors, en **Jordi** i en **Pierre**, per haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesi en aquest tema tant poc explorat i interessant. Han estat uns grans directors en tots els aspectes, gràcies per fer-me de guia al iniciar-me en el món científic, per ensenyar-me i per motivar-me a continuar i a millorar.

Jordi, gràcies per encomanar-me aquest interès i curiositat cap un sistema que casi desconeixia. Per pensar en mi des d’un primer moment, pels consells, les correccions i per l’ajuda que m’has ofert durant aquesta etapa tan important de la meua formació.

Merci Pierre, pour m’avoir laissé vivre au premier plan l’expérience de la Science et m’avoir fait partager ta passion du monde de l’audition. Merci pour la patience que tu m’as accordée pendant mon adaptation dans ce nouveau pays, pour m'avoir guidée, encouragée et conseillée.

Ensuite, merci à mes **collègues du labo**. Ca a vraiment été un grand plaisir de travailler avec vous ! C’était un véritable bonheur de partager chaque jour avec des personnes comme vous qui étiez capables m’aider à tout moment, comme de me faire rire dans les instants difficiles.

Au petit chef, **Benoît**, parce que, même si nous n'avons partagé qu'une courte période, je suis très heureuse d'avoir eu un chef comme toi. Merci pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de ta part et pour ton aide pendant cette dernière période de ma thèse, la plus compliquée ! Merci d'avoir supporté mes « râlements » et aussi pour tes rdv à 8h30... fabuleux !

Merci **Monique**, pour avoir accepté d'encadrer ce projet, et pour le temps que tu as dépensé pour m'aider dans mes missions. Pour les moments partagés à parler du magnifique temps de la Lorraine et pour la prévention, toujours la prévention. Pour ton désir de profiter au maximum de la vie.

A **Ludivine** même si on a peu travaillé ensemble, merci pour ta bonne humeur et ta vitalité contagieuse.

A **Benoît Cossec** pour vos corrections et pour vos blagues incompréhensibles.

Au petit nouveau, **Valentin**, pour me rappeler l'enthousiasme du début d'une thèse quand j'étais déjà à la fin. Parce que tu es tombé dans un magnifique labo et je suis sûre que dans 3 ans je vais t'appeler « docteur ». Courage, le chemin est long !!!

A **Chantal**, bien que nous n'ayons partagé qu'une année, c'était assez pour me contaminer de tes « conneries ». Merci pour tes conseils de « vieille », pour les expressions de l'âge de Mathusalem, pour faire un peu ma mère quand je suis arrivée. Merci surtout de m'avoir rappelé qu'il y a une vie après le travail et passé le témoin du noyau dur !

A **Lise**, pour ton aide précieuse, pour ton habileté avec la guillotine et pour ta rigueur au travail. Merci pour tes conseils et pour m'avoir rendu le chemin plus facile.

A **Stéphane**, tu es unique ! Pour tes *blablablablablablablablablablas*... interminables et ton incapacité à rester tranquille. Parce que j'ai connu une personne extraordinaire et toujours prête à m'aider et à m'écouter, même si je ne comprenais rien ! Pour tous les verres de l'amitié... et tous les verres en général. Pour les soirées interminables et les messages incompréhensibles. Merci pour tous les moments partagés ces trois années.

A l'homme de la compétence, **Thomas**. Merci, merci et merci. Parce que tu étais un pilier essentiel pendant cette thèse, mais surtout pendant plus de trois années. Pour ton aide essentielle, pour avoir toujours été là. Pour avoir essayé de m'expliquer trop de fois quelques notions du monde de l'acoustique. Pour ta patience infinie. Et on se voit dans 3 ans à ta soutenance, c'est promis ! Bref, merci car sans toi cela aurait été tellement différent et beaucoup plus difficile.

*The last, but not the least* (blagounette)... Qu'est-ce que je peux dire de toi, cocotta ? Pour toi j'ai besoin de 10 pages de plus ! **Aurélie**, il faut que le monde le sache, cette thèse ne serait rien sans toi, impossible. Tu le sais déjà, ma thèse est aussi ta thèse.

On s'est compris depuis le début. Avec toi tout a été beaucoup plus simple. Pour les milliers d'heures passées à la paillasse, les millions de dissections (sections !), avec et sans couleur, pour les tonnes de conseils et les mille techniques que tu m'as montré. Pour les traductions illégales, les posters, les figures... Bref, pour avoir travaillé pour et avec moi pendant toutes ces années. Tu es plus que la moitié de ce projet.

Mais surtout, surtout, pour les moments inaméliorables en dehors du labo. Pour toutes les heures en train de parler de la vie, pour les repas, les jeux de société, les week-ends trop courts et les soirées interminables. Pour les cours de français, d'espagnol et de català, et pour avoir tout mélangé ! Pour me faire rire toujours, et « m'obliger » à boire pour oublier ou fêter.

Parce qu'on n'était pas mal... au Brésil et à Minorque. Le petit serpent, les caipirinhas, Rio, la plage, le jaleo et la pomada... et pour tous les voyages qui nous restent encore.

Et pour beaucoup plus de choses ! Parce qu'après avoir partagé tant de moments ensemble, j'emporte beaucoup plus qu'une thèse.

Je ne regretterai jamais d'avoir décidé de m'embarquer dans cette aventure car j'ai connu une personne magnifique.

Je... tu...Bref, on va se manquer! Merci !!!!

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'**INRS**. Merci également à tout le **département TB** en général, pour votre accueil. Je peux dire que grâce à vous je pense que les français, finalement, ne sont pas si bizarres que ça.

Je veux surtout remercier le **labo GCAT**, **Frédéric**, **Hervé** et **Elodie**. Sans vous, l'intoxication n'aurait pas été possible, et donc ma thèse serait inexistante. Merci pour les heures aux cellules d'intox et surtout, Hervé, pour ta patience lors les 15 min.

A **Carole** et à **Sylvie**, pour m'avoir introduite dans le monde de la biomol, pour votre aide avec les ADN, ARN et compagnie, et pour avoir dépensé pas mal de temps pour me secourir. Ainsi qu'à **Aurélie Remy**, pour avoir révisé toutes mes analyses statistiques. Et aussi à **Karine** et **Martine**, les meilleures assistantes du monde. Et pour les soirées, surtout les soirées, Karine !

A tout le personnel de l'animalerie, **Marie-Jo**, **Laurine** et **Lionel**, pour avoir pris soin de mes **rats**, et surtout pour les pauses café.



A **Fréd**, parce qu'on était comme un couple sans être un vrai couple, c'est-à-dire, des colloques ! Parce que je n'aurais jamais pu choisir une meilleure colocataire qui est devenue une amie. Merci d'avoir accueilli une étrangère. Pour tous tes cours de français, avec des expressions super importantes, pour tous les sushis, pour les « crêpes party » et pour tous les épisodes de plus belle (j'ai le droit de le dire ici !). Merci de toujours t'être intéressée à ma thèse et d'avoir essayé de comprendre quelque chose... et surtout pour les apéros !

Et à **Anne**, pour ta gentillesse, ta sympathie et surtout pour avoir le courage de « supporter » Fred ! Parce que j'ai passé de très bons week-ends avec toi et parce que, je dois le reconnaître, j'ai adoré être en majorité étrangère dans l'appart.

A voltrus, **monets**. Perquè heu estat i sereu massa importants. Hem passat grans coses i hem crescut i madurat juntes. No podria haver-ho fet sense voltrus. Perquè per molt enfora que hagi anat, sempre us he tingut molt a prop. Per donar-me aquelles estones de *relax*, de desconexió, d'alegria, per deixar-me desfogar i sobretot per fer-me riure en moments en els quals semblava impossible... per fer-me passar uns moments immillorables. Per animar-me sempre a seguir i no deixar de repetir aquella frase de "*venga, que hi queda poc!*". I perquè encara que estigués cansada de jo mateixa, voltrus m'heu seguit aguantant (crec que no heu tingut més remei...).

Gràcies **Mercè** i **Sandra**, per fer-me un racó durant ses meves escapades... i, sobretot, a sa vostra vida. Per compartir aquest camí des de sempre i per sempre.

Gràcies **Marga**, per es moments que m'has donat i, per "bona" sort, més m'hauràs de donar ara.

Gràcies **Blanca** i **Coll**, perquè tot i també haver triat s'exili sempre hi heu estat quan ha fet falta.

Per sa pròxima estació... I per sempre, sou imprescindibles.

A n'es meu perfecte imperfecte, **Mir**. Perquè no crec que hi hagi ningú que cregui tant en sa capacitat dels altres com tu. Ets una persona que encomana alegria i vitalitat. Per ses mils de xerrades d'abans, de durant, de després i de i per sempre. Perquè no sé com et vas deixar convèncer per començar un doctorat... I perquè, com ja saps, te vull tenir sempre a n'es meu costat.

A sa meva **família**. Tota. Ties, concos, cosins i cosines. Per no cansar-vos mai de fer aquella pregunta cada vegada que feia una escapada a casa; “*Com dus es doctorat? Què faràs en acabar?*”. Per donar-me moments concrets i no tant concrets, per dinars i sopars, per trobades, per ser d’on venc i d’on pertany.

A voltrus, **Ari** i **Arantxa**. Perquè encara que rarament hem seguit es nostres consells, mai hem deixat de donar-los. Perquè es cosins, putatius o no, poden convertir-se en grans amics i pilars fonamentals. I per ses aventures que mos esperen en breus, **Mireia**!

Als meus **avis**. Perquè sou es tresor més gran d’aquesta vida. Perquè encara que pensàveu que havia partit casi al pol nord i passava una gran odissea per tornar a casa, després de sa pregunta “*quan tornes?*” sempre hi havia un “*i no pots venir abans?*”. Especialment per tu, s’avia **Isabel**, perquè seràs sempre una de ses meves persones preferides i encara em costa imaginar que ja no hi ets. Perquè mai he pogut arribar a agrair-te tot el que has fet per jo i tot el m’has aportat. Allà on siguis sé que estaràs molt orgullosa de jo, igual que jo ho estic d’haver-te tingut sempre a n’es meu costat. I, perquè simplement t’enyor.

A ses meves germanes, **Gemma** i **Anna**. Per s’interès que han mostrat per intentar entendre el que faig. Per fer-me veure sempre un pas més enllà i, moltes vegades, intentar aturar ses meves bogeries sense massa èxit. Perquè no teniu més remei que suportar-me i, perquè encara que mai vos doni sa raó, alguna vegada la teniu. Sou en part responsables de que avui sigui on som, i tot açò seria massa diferent sense voltrus.

I, per descomptat, a n’es meus pares, **Rosa** i **Josep**, que fa molts anys que em coneixeu. Perquè no estaria aquí si no hagués estat per sa vostra ajuda, possiblement sa més desinteressada que es pot tenir. Per s’educació, es valors i, sobretot, per s’amor. Per creure amb jo i ser-hi incondicionalment, i per sa paciència, poca, que encara heu de tenir. Per encoratjar-me en tot moment i per no deixar mai de repetir aquella frase de “*tot esforç té sa seva recompensa*”. No puc estar més orgullosa de tenir-vos com a pares. Encara que no us ho digui massa, us estim moltíssim.

Sí, ha costat, però aquí estem. La ciència és així, exigent, però tot l'esforç val la pena per aquell petit instant en què veus que alguna cosa comença a encaixar. Podríem dir que és un viatge cap al desconegut i sense xarxa, però, si n'hi hagués... on seria l'aventura? Per sort, no he estat mai sola en aquest viatge.

Des d'ara mateix el meu camí continua cap a nous horitzons que, francament, no sé cap on em portaran (*mystère et boule de gomme...*). Però, a tothom, sincerament, moltíssimes gràcies!

*“Que tot està per fer i tot és possible”*

*Miquel Martí i Pol.*

***“If we knew what it was we were doing,  
it would not be called research, would it?”***

***Albert Einstein***



# ÍNDEX



---

<b>1. ABREVIATURES .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Sistemes sensorials: generalitats .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Sistema auditiu .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Anatomia de l'orella .....	10
2.2.1.1.Orella externa .....	10
2.2.1.2.Orella mitjana .....	11
2.2.1.3.Orella interna .....	11
2.2.2. La còclea .....	12
2.2.3. Cèl·lules ciliades coclears i la seva innervació.....	14
2.2.3.1.Cèl·lules ciliades internes .....	15
2.2.3.2.Cèl·lules ciliades externes .....	16
2.2.3.3.Innervació de les cèl·lules ciliades coclears .....	17
2.2.4. El so .....	18
2.2.5. Transducció del so .....	19
2.2.5.1.Conducció del so per l'orella externa .....	20
2.2.5.2.Conducció del so per l'orella mitjana .....	20
2.2.5.3.Conducció del so per l'orella interna .....	21
2.2.6. Vies auditives centrals .....	25
2.2.6.1.Tronc cerebral .....	27
2.2.6.2.Tàlem i escorça auditiva .....	28
2.2.7. Reflexos auditius .....	29
2.2.7.1.Reflex de l'orella interna .....	29
2.2.7.2.Reflex de l'orella mitjana .....	30
2.2.8. Disfunció auditiva.....	31
2.2.8.1.Presbiacúsia .....	32
2.2.8.2.Medicaments i solvents ototòxics .....	32
2.2.8.3.Traumatisme acústic .....	33
2.2.8.4.Excitotoxicitat .....	33
2.2.8.5.Possibles tractaments .....	34



<b>2.3. Sistema vestibular</b> .....	35
2.3.1. Laberint vestibular perifèric .....	36
2.3.2. Cèl·lules ciliades vestibulars i la seva innervació.....	37
2.3.2.1. Tipus de cèl·lules ciliades .....	38
2.3.2.2. Mecanisme de transducció .....	40
2.3.2.3. Innervació de les cèl·lules ciliades vestibulars .....	41
2.3.3. Epitelis vestibulars.....	41
2.3.3.1. Conductes semicirculars .....	42
2.3.3.2. Òrgans otolítics .....	44
2.3.4. Vies vestibulars centrals .....	47
2.3.4.1. Gangli i nervi vestibular .....	48
2.3.4.2. Nuclis vestibulars .....	49
2.3.4.3. Cerebel .....	50
2.3.4.4. Tàlem i escorça vestibular .....	50
2.3.5. Reflexos vestibulars .....	50
2.3.5.1. Reflex vestibulo-espinal .....	51
2.3.5.2. Reflex vestibulo-ocular .....	51
2.3.6. Disfunció vestibular.....	54
2.3.6.1. Pèrdua de la funció vestibular per l'edat .....	54
2.3.6.2. Medicaments i solvents ototòxics .....	55
2.3.6.3. Possibles tractaments .....	55
 <b>2.4. El soroll</b> .....	 56
2.4.1. Soroll i audició .....	56
2.4.2. Soroll i vestíbul .....	59
2.4.3. Soroll de baixes freqüències .....	60
 <b>2.5. Ototoxicitat</b> .....	 61
2.5.1. Substàncies ototòxiques .....	61
2.5.2. Mecanisme d'ototoxicitat.....	63
2.5.2.1. Vies de mort cel·lular activades pels agents ototòxics .....	64
2.5.2.2. Cèl·lules ganglionars i terminals aferents en el dany ototòxic .....	65
2.5.2.3. Reparació de l'epiteli sensorial i possible teràpia .....	65
2.5.3. Co-exposició: els agents ototòxics accentuen el risc induït pel soroll .....	66

<b>2.6. Disulfur de carboni .....</b>	<b>68</b>
2.6.1. Producció i ús del CS <sub>2</sub> .....	68
2.6.2. Fonts del CS <sub>2</sub> i possible exposició .....	68
2.6.3. Cinètica i metabolisme del CS <sub>2</sub> .....	69
2.6.3.1. Absorció .....	69
2.6.3.2. Distribució .....	69
2.6.3.3. Metabolisme .....	70
2.6.3.4. Excreció .....	71
2.6.4. Efectes sobre la salut: toxicitat del CS <sub>2</sub> .....	71
2.6.5. Neurotoxicitat del CS <sub>2</sub> .....	72
2.6.6. Ototoxicitat del CS <sub>2</sub> .....	74
 <b>3. OBJECTIUS .....</b>	 <b>75</b>
 <b>4. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	 <b>79</b>
4.1. Animals .....	81
4.2. Protocol experimental .....	82
4.3. Exposició.....	86
4.3.1. Exposició al CS <sub>2</sub> .....	86
4.3.1.1. Anàlisi de la concentració de CS <sub>2</sub> .....	87
4.3.2. Exposició al soroll .....	87
4.3.2.1. Soroll a 8 kHz .....	88
4.3.2.2. Soroll ric en baixes freqüències .....	89
4.4. Mesures funcionals .....	91
4.4.1. Productes de distorsió acústics .....	91
4.4.1.1. Mesura dels productes de distorsió acústics .....	92

4.4.2. Reflex vestibulo-ocular .....	93
4.4.2.1.Cirurgia .....	94
4.4.2.2.Període d'habitació .....	95
4.4.2.3.Mesura del nistagme post-rotatori .....	95
<b>4.5. Mesures de comportament .....</b>	<b>97</b>
4.5.1. Avaluació del reflex d'aterratge .....	97
4.5.2. Avaluació del reflex d'incorporació en l'aire .....	98
4.5.3. Avaluació de la superfície de sustentació .....	99
4.5.4. Locotronic® .....	99
<b>4.6. Tècniques químic analítiques.....</b>	<b>100</b>
4.6.1. Concentració de CS <sub>2</sub> en la sang.....	100
4.6.1.1.Extracció de la sang venosa .....	100
4.6.1.2.Anàlisi de la concentració de CS <sub>2</sub> .....	100
4.6.2. Concentració de TTCA en l'orina .....	101
4.6.2.1.Recull d'orines .....	101
4.6.2.2.Anàlisi de la concentració de TTCA .....	101
4.6.3. Concentració de CS <sub>2</sub> al cervell .....	102
4.6.3.1.Dissecció del cervell .....	102
4.6.3.2.Anàlisi de la concentració de CS <sub>2</sub> .....	102
<b>4.7. Tècniques histològiques .....</b>	<b>103</b>
4.7.1. Microscòpia òptica .....	103
4.7.1.1.Inclusió de la còclea (òrgan de Corti i gangli espiral) .....	103
4.7.1.2.Inclusió de l'epiteli vestibular (utricle, sàcul i crestes) .....	105
4.7.1.3.Inclusió del gangli de Scarpa .....	105
4.7.1.4.Cocleograma .....	106
4.7.2. Immunohistoquímica i microscòpia de fluorescència confocal .....	107
4.7.2.1.Immunohistoquímica de la còclea .....	107
4.7.2.2.Immunohistoquímica de l'epiteli vestibular .....	108
4.7.3. Microscòpia electrònica de rastreig (MER) .....	110
4.7.3.1.MER de la còclea .....	110
4.7.3.2.MER de l'epiteli vestibular .....	111

<b>4.8. Tècniques moleculars .....</b>	<b>112</b>
4.8.1. Extracció del ARN total .....	112
4.8.2. Tractament amb desoxiribonucleasa .....	113
4.8.3. Anàlisi de la qualitat dels ARNs .....	113
4.8.4. Síntesis del ADN complementari (ADNc) .....	114
4.8.5. Amplificació PCR .....	114
4.8.5.1. Placa amb gens característics de la neurotoxicitat .....	115
4.8.5.2. PCR dels gens <i>lta</i> , <i>mmp9</i> , <i>Il10</i> , <i>cdkn1a</i> i <i>trmp1</i> .....	116
4.8.5.3. Anàlisi dels resultats de la PCR .....	116
<b>4.9. Anàlisi estadístics .....</b>	<b>117</b>
<b>5. RESULTATS .....</b>	<b>119</b>
<b>5.1. CAPÍTOL I: EFECTE DE LA CO-EXPOSICIÓ AL SOROLL RIC EN BAIXES FREQUÈNCIES I AL CS<sub>2</sub> .....</b>	<b>121</b>
5.1.1. Salut general dels animals .....	124
5.1.2. Efecte sobre el sistema auditiu .....	126
5.1.2.1. Funció auditiva: productes de distorsió acústics .....	126
5.1.2.2. Anàlisi histològiques .....	128
5.1.3. Efecte sobre el sistema vestibular .....	137
5.1.3.1. Funció vestibular: nistagme post-rotatori .....	137
5.1.3.2. Comportament .....	139
5.1.3.3. Anàlisi histològics .....	140
5.1.4. Efecte sobre el sistema nerviós central .....	144
<b>5.2. CAPÍTOL II: EFECTE DOSIS-RESPOSTA DEL CS<sub>2</sub> .....</b>	<b>145</b>
5.2.1. Salut general dels animals .....	148
5.2.2. Metabolisme .....	149
5.2.2.1. Concentració de CS <sub>2</sub> : atmosfèrica vs. sanguínia .....	149
5.2.2.2. Concentració de CS <sub>2</sub> atmosfèrica vs. concentració de TTCA urinària .....	150

5.2.3. Efecte sobre el sistema auditiu .....	151
5.2.3.1.Funció auditiva: productes de distorsió acústics .....	151
5.2.3.2.Anàlisis histològiques .....	154
5.2.4. Efecte sobre el sistema vestibular .....	157
5.2.4.1.Funció vestibular: nistagme post-rotatori .....	157
5.2.4.2.Comportament .....	159
5.2.4.3.Anàlisis histològiques .....	160

### **5.3. CAPÍTOL III: EXPOSICIÓ AL CS<sub>2</sub>: CONTÍNUA VS.**

<b>INTERMITENT.....</b>	<b>163</b>
5.3.1. Salut general dels animals .....	166
5.3.2. Metabolisme .....	167
5.3.2.1.Concentració de CS <sub>2</sub> per una concentració atmosfèrica de 250 ppm amb diferents patrons temporals .....	167
5.3.2.2.Comparació entre 63 ppm continu i 250 ppm intermitent .....	169
5.3.3. Efecte sobre el sistema auditiu .....	170
5.3.3.1.Funció auditiva: productes de distorsió acústics .....	170
5.3.3.2.Anàlisis histològiques .....	174
5.3.4. Efecte sobre el sistema vestibular .....	180
5.3.4.1.Funció vestibular: nistagme post-rotatori .....	180
5.3.4.2.Comportament .....	183
5.3.4.3.Anàlisis histològiques .....	184

### **5.4. CAPÍTOL IV: EFECTE DEL CS<sub>2</sub> SOBRE EL ROM .....**

5.4.1. Salut general dels animals .....	190
5.4.2. Funció auditiva .....	191
5.4.2.1.Exposició al CS <sub>2</sub> i/o al soroll (continu o impulsu) .....	191
5.4.2.2.Comparació entre les diferents condicions experimentals .....	193
5.4.3. Anàlisis histològiques .....	195
5.4.3.1.Microscòpia electrònica de rastreig: estat dels estereocilis .....	195
5.4.3.2.Cocleograma .....	197

<b>6. DISUSSIÓ .....</b>	<b>203</b>
6.1. Efecte de la co-exposició al soroll ric en baixes freqüències i al CS <sub>2</sub> .....	205
6.2. Efecte dosis-resposta del CS <sub>2</sub> .....	213
6.3. Exposició al CS <sub>2</sub> : contínua vs. intermitent .....	216
6.4. Efecte del CS <sub>2</sub> sobre el reflex de l'orella mitjana .....	219
6.5. Valors límits d'exposició professional .....	221
6.6. Consideracions finals .....	222
 <b>7. CONCLUSIONS .....</b>	 <b>225</b>
 <b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	 <b>229</b>
 <b>9. ANNEX.....</b>	 <b>257</b>
9.1. Protocol de supervisió dels animals .....	259
9.2. Article 1: "Carbon disulfide potentiates the effects of impulse noise on the òrgan of Corti" .....	261
9.3. Article 2: "Continuous exposure to low-frequency noise and carbon disulfide: Combined effects on hearing" .....	271
9.4. Article 3: "Combined exposure to carbon disulfide and low-frequency noise reversibly affects vestibular function" .....	283



# **1 . ABREVIATURES**





<b>ADN:</b> àcid desoxiribonucleic	<b>NCD:</b> nucli coclear dorsal
<b>ADNc:</b> àcid desoxiribonucleic complementari	<b>NCV:</b> nucli coclear ventral
<b>ANOVA:</b> anàlisi de la variància	<b>NPR:</b> nistagme post-rotatori
<b>ARN:</b> àcid ribonucleic	<b>ON:</b> <i>over night</i> (tota la nit)
<b>ATP:</b> adenosina-5'-trifosfat	<b>PBS:</b> <i>phosphate buffered saline</i> (tampó fosfat salí)
<b>CCE:</b> cèl·lula ciliada externa	<b>PCR:</b> reacció en cadena de la polimerasa
<b>CCI:</b> cèl·lula ciliada interna	<b>PDA:</b> productes de distorsió acústics
<b>Cideb:</b> <i>cell death-inducing DFFA-like effector B</i>	<b>ppm:</b> part per milió
<b>Cl<sup>-</sup>:</b> ió clor	<b>ROC:</b> reflex optocinètic
<b>COS:</b> complex olivar superior	<b>ROI:</b> reflex de l'orella interna
<b>CS<sub>2</sub>:</b> disulfur de carboni	<b>ROM:</b> reflex de l'orella mitjana
<b>dB:</b> decibels	<b>ROS:</b> <i>reactive oxidative species</i> (espècies reactives de l'oxigen)
<b>DCM:</b> clorur de metilè	<b>RVC:</b> reflex vestibulo-còlic
<b>EPON:</b> <i>epoxy embedding medium</i>	<b>RVE:</b> reflex vestibulo-espinal
<b>GABA:</b> àcid gamma-aminobutíric	<b>RVO:</b> reflex vestibulo-ocular
<b>Hz:</b> hertz	<b>SDH:</b> succinat deshidrogenasa
<b>i.p.:</b> intraperitoneal	<b>SEM:</b> error estàndard de la mitjana
<b>IHQ:</b> immunohistoquímica	<b>SNC:</b> sistema nerviós central
<b>K<sup>+</sup>:</b> ió potassi	<b>SPL:</b> <i>sound pressure level</i> (nivell de pressió sonora)
<b>L<sub>EX,8h</sub>:</b> límit d'exposició diària al soroll	<b>TA:</b> temperatura ambient
<b>MEK:</b> metiletilcetona	<b>Trpm1:</b> <i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 1</i>
<b>MER:</b> microscopi electrònic de rastreig	<b>TTCA:</b> àcid 2-thioxotiazolina-4-carboxilic
<b>Na<sup>+</sup>:</b> ió sodi	

**VLEP:** valor límit d'exposició  
professional

**VLEP<sub>8h</sub>:** valor límit d'exposició  
professional diària

**VLEP<sub>CT</sub>:** valor límit d'exposició  
professional a curt terme

## **2 . INTRODUCCIÓ**



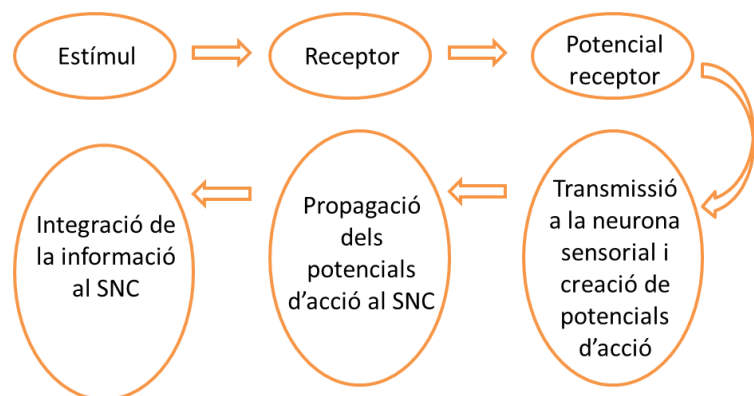
## 2.1 Sistemes sensorials: generalitats

La **percepció** del món que ens rodeja - les textures, els colors, els sons, la calor, els aromes i els sabors - s'aconsegueix a través del funcionament dels **sistemes sensorials**. La **sensibilitat** implica la capacitat de transducció, codificació i, finalment, percepció analitzada a nivell de l'encèfal a partir de la informació generada pels estímuls originats al medi extern i intern.

Encara que trobem grans divergències entre els diferents sentits, algunes regles fonamentals determinen la manera en que el sistema nerviós gestiona les diferents modalitats.

La informació del medi ambient i del medi intern, és a dir, els **estímuls**, arriben a les **cèl·lules receptores sensorials**, estructures altament especialitzades i sensibles a un tipus d'estímul concret. Aquests receptors transformen la informació del medi en senyals elèctriques que es dirigeixen al **sistema nerviós central (SNC)** mitjançant fibres nervioses aferents. Aquest procés s'anomena **transducció sensorial** (Fig. 11). Quan el receptor és estimulat modifica la permeabilitat de la membrana, permetent així la difusió de ions a través d'ella i, conseqüentment, generant un potencial elèctric anomenat **potencial receptor**. Els receptors poden ser cèl·lules especialitzades (receptor secundari) o, directament, neurones sensorials (receptor primari). En els

receptors primaris es produeix un flux de corrent que es dispersa al llarg de la fibra nerviosa i, si l'amplitud del potencial és suficient, es formen **potencials d'acció** que es transmeten cap al SNC. En els receptors secundaris, el potencial receptor es transmet a la neurona aferent primària amb la qual estableix sinapsis.



**Figura 11.** Exemple de les principals etapes de la transducció sensorial quan un estímul actua sobre un receptor secundari neurosensorial.

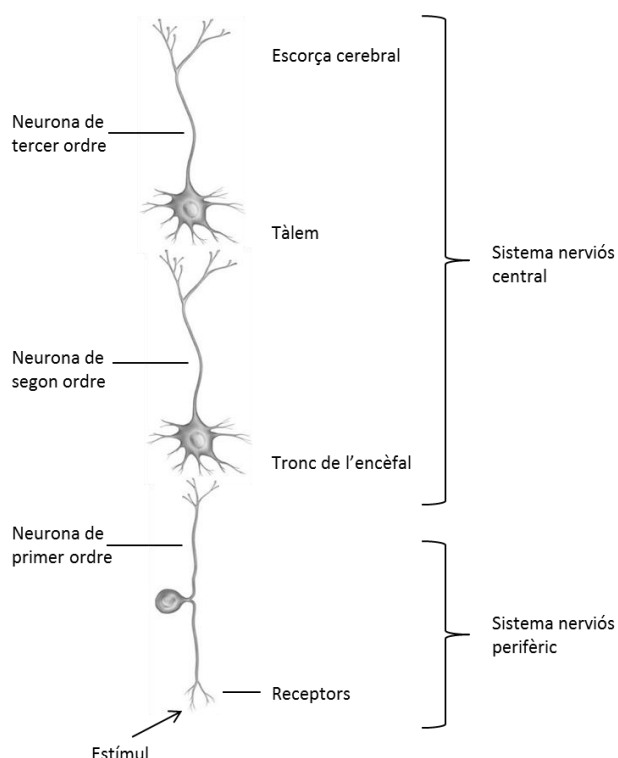
La **intensitat** de l'estímul està relacionada amb la freqüència dels potencials i el número de receptors activats. Els estímuls més forts produeixen una major freqüència de potencials i activen un major número de receptors. Si l'estímul és positiu, la cèl·lula es despolaritza i si supera el llindar es genera un potencial d'acció, contràriament, si l'estímul és inhibitori, la cèl·lula s'hiperpolaritza i disminueix la probabilitat de que es generi un potencial d'acció.

La **duració** de la resposta depèn de la intensitat i de la permanència del propi estímul. Alguns receptors segueixen responenent a un estímul encara que aquest perduri un llarg temps. No obstant, la majoria de receptors s'adapten a l'estímul, és a dir, la seva resposta disminueix amb el pas del temps. L'**adaptació del receptor** és la capacitat del receptor per respondre davant un estímul constant.

Cada un dels sentits a través del qual es rep informació sensitiva s'anomena **modalitat**. Els **receptors** estan dividits en quatre grups principals segons el tipus d'estímul al qual són més sensibles; **estímul adequat** (Fig. I2). Els quimioreceptors responen a lligands químics (gust i olfacte). Els mecanoreceptors responen a diferents formes d'energia mecànica, que inclou pressió, vibració, acceleració i so (audició, equilibri, tacte...). Els termoreceptors responen a la temperatura i els fotoreceptors a la llum (visió).

TIPUS DE RECEPTOR	EXEMPLES D'ESTÍMULS
Quimioreceptors	Oxigen, pH, molècules orgàniques...
Mecanoreceptors	Pressió, estirament cel·lular, vibració, acceleració, so...
Fotoreceptors	Fotons
Termoreceptors	Variacions de calor

**Figura I2.** Principals tipus de receptors sensorials.

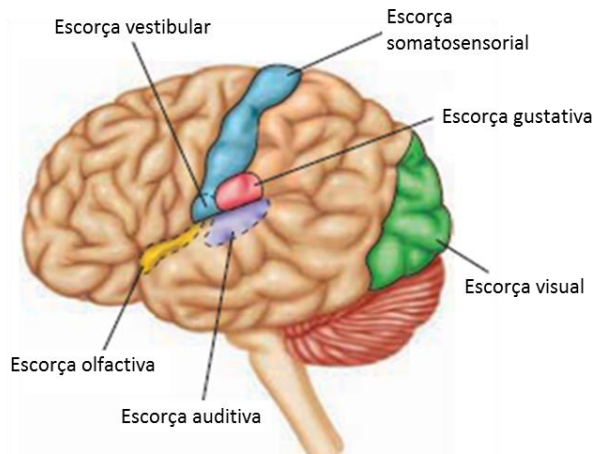


**Figura I3.** Via general dels sistemes sensorials.

Les neurones sensorials formen connexions sinàptiques i creen circuits. La major part de la informació sensitiva passa per la medulla espinal i, a través de vies ascendents, arriba a l'encèfal o es dirigeix directament al tronc encefàlic. La neurona aferent que transmet informació des de la perifèria al SNC és la **neurona de primer ordre**. Aquestes neurones poden comunicar-se amb diverses **interneurones**. A més, les interneurones poden rebre informació de varies neurones de primer ordre. Algunes d'aquestes interneurones, les **neurones de segon ordre**, transmeten la informació al **tàlem**. Finalment, el tàlem transmet la informació a l'**escorça cerebral** a través de les **neurones de tercer ordre** (Fig. I3).

Les **neurones centrals** tenen la capacitat de plasmar tant la naturalesa com la intensitat de l'estímul i, en alguns casos, la localització i duració d'aquest. Per tant, el SNC és capaç de diferenciar quatre propietats de l'estímul: la seva naturalesa o **modalitat**, la seva **intensitat**, la seva **localització** i la seva **duració**.

Cada via sensitiva es projecta cap a una regió específica de l'escorça cerebral, dedicada a un camp perceptiu particular (Fig. I4).



**Figura I4.** Zones sensorials de l'escorça cerebral. Font: imatge adaptada de *Principios de Fisiología humana*. Stanfield.

El **sistema vestibular** (sentit de l'equilibri) i el **sistema auditiu** (sentit de l'oïda) són dos sistemes sensorials que comparteixen similituds mecàniques i estructurals.

La íntima relació entre la **còclea**, òrgan de l'audició, i el **laberint vestibular**, òrgan de l'equilibri, va més enllà del seu origen embrionari comú. Els elements perifèrics d'ambdós sistemes estan units i comparteixen components estructurals, utilitzen cèl·lules ciliades com transductors mecànics, i transmeten informació al SNC a través del nervi vestibulococlear, anomenat també nervi VIII. Ara bé, el processament per part del SNC i les funcions sensorials d'ambdós sistemes són diferents. La funció principal del sistema auditiu és traduir el so, mentre que la del sistema vestibular és proporcionar informació relacionada amb la posició i els moviments del cos en l'espai.

*“Desconfieu dels vostres sentits!”*

*Immanuel Kant*



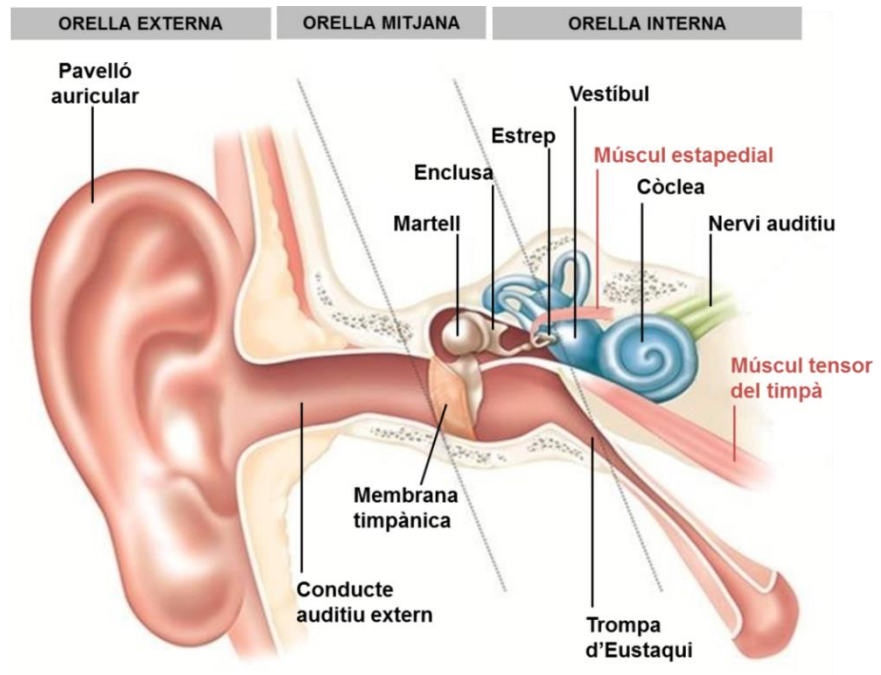
## 2.2 Sistema auditiu

El **sistema auditiu** designa el conjunt d'estructures implicades en el tractament del missatge auditiu, des del pavelló auditiu fins a les àrees auditives corticals.

L'**audició** és el procés sensorial específic mitjançant el qual l'ésser viu rep i analitza el **so**, és la nostra percepció de l'energia transportada per ones sonores. Aquesta capacitat ens permet comunicar-nos amb els altres organismes i amb el medi ambient.

### 2.2.1 Anatomia de l'orella

L'aparell auditiu perifèric és l'**orella**. L'orella dels mamífers està formada per tres parts (Fig. I5): **orella externa**, **orella mitjana** i **orella interna**. L'orella interna és comú a tots els vertebrats, i en el cas dels mamífers, es troba situada dins de l'os temporal del crani.



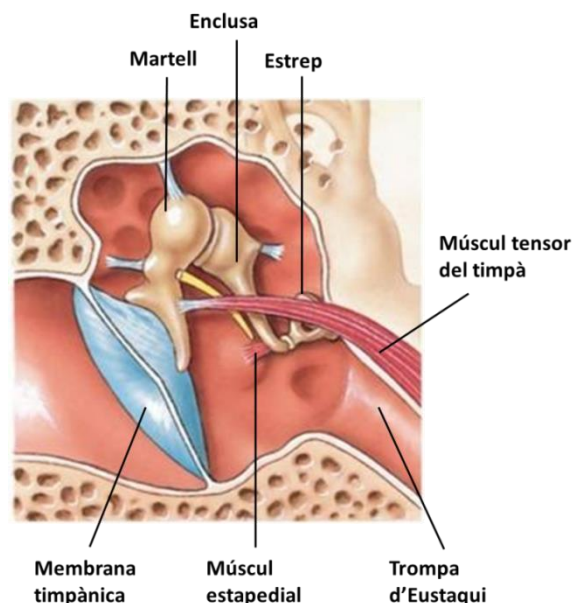
**Figura I5.** Anatomia de l'orella. Principals estructures de l'orella externa, mitjana i interna. Font: INRS.

#### 2.2.1.1 Orella externa

L'orella externa és la part visible de l'òrgan. Està formada pel **pavelló auditiu**, un teixit fibro-cartilaginós que difracta les ones sonores, i el **conducte auditiu extern** d'una longitud d'uns 2,5 cm i un diàmetre de 0,6 cm (Fig. I5). El **timpà** és la membrana de col·lagen que separa el conducte auditiu extern de la cavitat de l'orella mitjana.

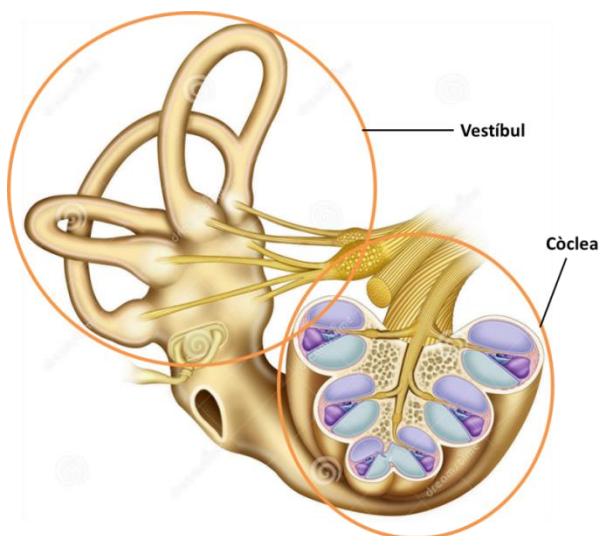
### 2.2.1.2 Orella mitjana

L'orella mitjana està connectada a la cavitat oral per la **trompa d'Eustaqui** (Fig. I5 i I6), la qual permet igualar la pressió de l'aire a ambdós costats del timpà. La **finestra oval**, sobre la qual es recolza la base de l'estrep, i la **finestra rodona** separen l'orella mitjana de l'interna. La cadena de ossets inclou el **martell**, l'**enclusa** i l'**estrep** (Fig. I6).



**Figura I6.** Anatomia de l'orella mitjana. Principals estructures. Font: imatge adaptada de Spring.

### 2.2.1.3 Orella interna



**Figura I7.** Òrgans que es troben dins l'orella interna: còclea (òrgan de l'audició) i vestibul (òrgan de l'equilibri). Font: imatge adaptada de dreamstime.

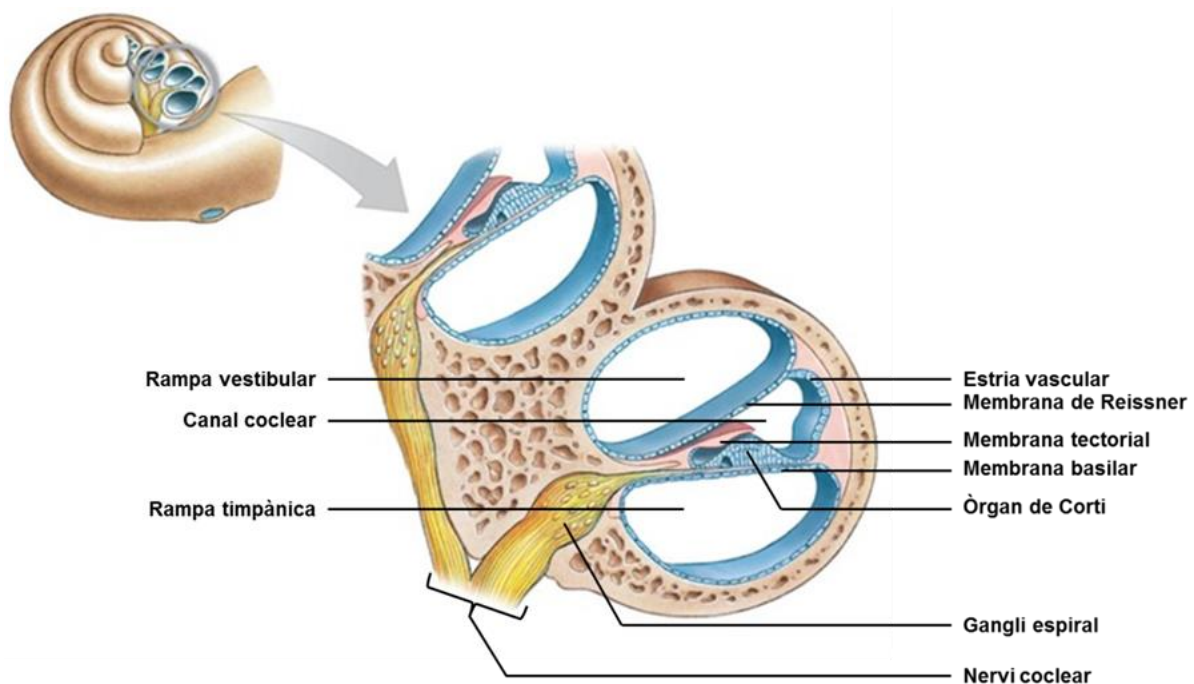
L'orella interna es troba dins la part més densa de l'os temporal i està formada per dos laberints; el **laberint ossi** i el **laberint membranós**. El **laberint ossi** és un embolcall que acull i protegeix les estructures sensorials i està format per tres **canals semicirculars**, la **còclea** i una cambra central, el **vestíbul**. Al seu interior trobem un sistema tancat i ple de líquid, el **laberint membranós**, format de sacs membranosos, el qual conté l'epiteli sensorial de l'audició, l'**òrgan de Corti**, i de l'equilibri, l'**epiteli vestibular** (Fig. I7).

L'**artèria auditiva** interna, que sol ser una branca de l'artèria cerebel·losa antero-inferior, subministra sang a l'orella interna. Aquest vas sanguini entra dins l'os temporal pel conducte auditiu intern i es divideix en dos; l'arteria anterior vestibular i l'arteria coclear comú.

### 2.2.2 La còclea

La **còclea**, com es veurà més endavant, és l'òrgan on es porta a terme la **transducció del so en missatge auditiu** i, per tant, l'estructura fonamental de la via auditiva. Aquest òrgan transforma les ones sonores en impulsos nerviosos auditius i actua com un analitzador de freqüències.

La còclea és un òrgan en forma d'espiral que s'enrotlla al voltant d'un eix ossi, la **columel·la**, formant una part basal i part una apical (Fig. I8). Consisteix en un component del **laberint membranós** englobat pel **laberint ossi**. El component del laberint ossi de la còclea es divideix en varies cambres espirals i paral·leles. La rampa central s'anomena **canal coclear** (o rampa mitjana) on trobem el receptor auditiu, l'**òrgan de Corti**, que s'estén al llarg de la còclea entre dues rampes. Una de les parets d'aquesta rampa està formada per la **membrana basilar**, l'altra per la **membrana de Reissner**, i la tercera per l'**estria vascular**. Per sobre i sota d'ella trobem les **rampes vestibular** i **timpànica**, respectivament, que es comuniquen per l'**helicotrema**, situat a l'àpex. La base de l'estrep està connectat amb el líquid de la rampa vestibular a través de la **finestra oval**. La membrana flexible de la **finestra rodona** separa el líquid de la rampa timpànica de la cavitat de l'orella mitjana.



**Figura I8.** Anatomia de la còclea i les seves parts. El laberint membranós es troba dins del laberint ossi. Font: imatge adaptada de Spring.

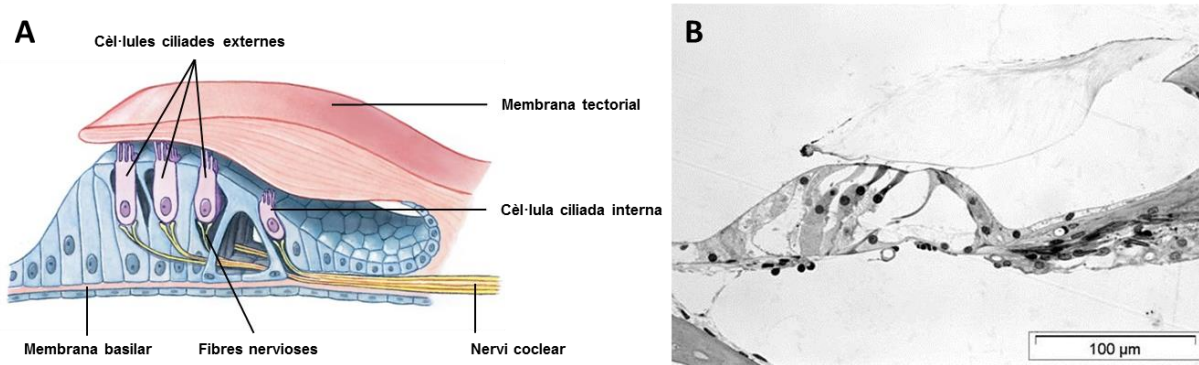
Els espais interns de la còclea estan plens de dos líquids diferents (Slepecky, 1996). El líquid que es troba dins les rampes vestibular i timpànica, és la **perilimfa**, amb una composició iònica pròxima a la del medi extracel·lular; alta concentració de ions sodi [ $\text{Na}^+$ ] (uns 140 mM) i baixa concentració de ions potassi [ $\text{K}^+$ ] (uns 4-5 mM). El líquid del laberint membranós, que inclou el canal coclear, és l'**endolimfa**, la qual conté una alta concentració de ions potassi [ $\text{K}^+$ ] (uns 150 mM) i una baixa concentració de ions sodi [ $\text{Na}^+$ ] (aproximadament 1 mM), una composició semblant al líquid intracel·lular. L'endolimfa és secretada de manera contínua per l'**estria vascular**, una estructura epitelial complexa composta per diferents tipus cel·lulars i vasos sanguinis. Ambdós líquids contenen una elevada concentració de l'ió clor [ $\text{Cl}^-$ ]. En condicions normals, ambdós compartiments no es comuniquen. Els dos líquids intervenen en el funcionament normal del sistema i, moltes vegades, les alteracions en la distribució o composició iònica d'aquests provoquen un trastorn a l'audició.

Els líquids de la còclea tenen un paper molt important pel bon funcionament auditiu:

1. Transmeten les vibracions de l'estrep.
2. Asseguren la pressió intracoclear per tal de que el receptor funcioni.
3. Aporten nutrients i permeten eliminar els productes del catabolisme de les cèl·lules que es troben en contacte amb la sang.
4. Aporten l'ambient iònic que es requereix per assegurar les transduccions energètiques.
5. Asseguren l'existència del potencial endococlear.

El **potencial endococlear** és un potencial positiu continu generat per la diferent composició iònica entre l'endolimfa i la perilimfa (+80 mV).

L'epiteli sensorial responsable de la transducció del so, és a dir, el receptor auditiu, és l'**òrgan de Corti** (Fig. I9), el qual es troba dins el canal coclear (Fig. I8). Aquest òrgan descansa sobre la membrana basilar, construïda essencialment de fibres de col·làgena. El receptor auditiu conté dos tipus de cèl·lules receptores responsables de la percepció del so; les **cèl·lules ciliades externes (CCE)** i les **cèl·lules ciliades internes (CCI)** (Slepecky, 1996). També conté **cèl·lules de suport**, com les cèl·lules de Deiters, cèl·lules de Hensen i cèl·lules de Claudius, entre altres. L'òrgan de Corti està recobert per la **membrana tectorial**, una membrana acel·lular de glicoproteïnes. L'àpex de les cèl·lules ciliades i de diferents cèl·lules de suport formen la **membrana reticular**, rica en actina i miosina.



**Figura 19.** Anatomia de l'òrgan de Corti i les seves parts. (A) Dibuix de l'anatomia de l'òrgan de Corti i les seves parts. Font: imatge adaptada de Spring. (B) Secció histològica del canal coclear amb l'òrgan de Corti.

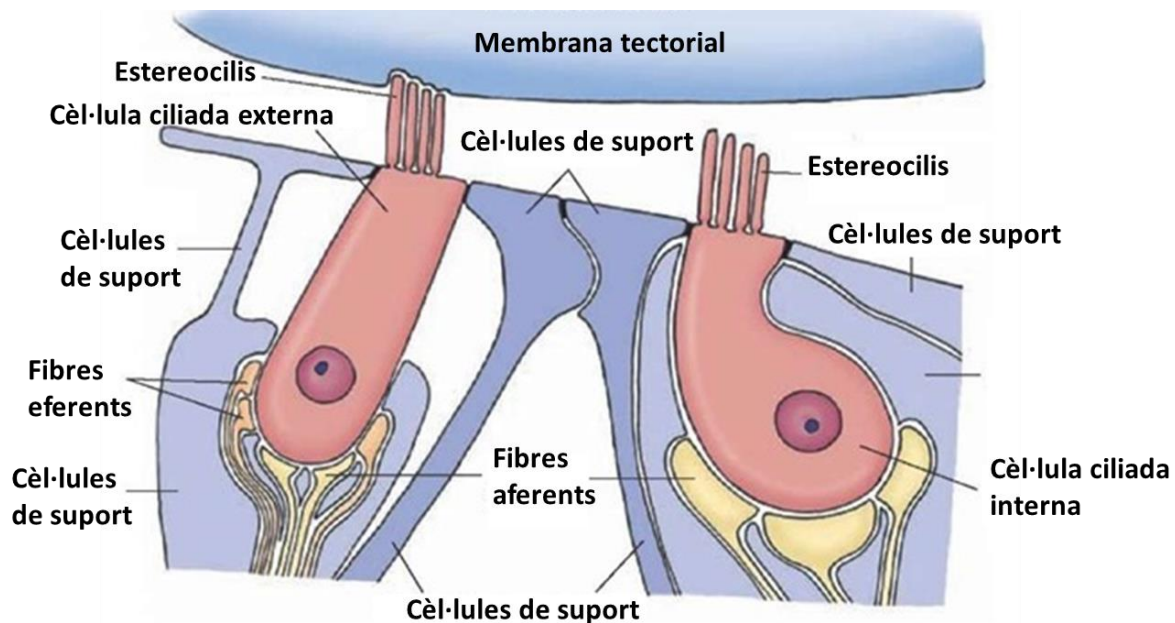
Les cèl·lules ciliades fan sinapsis amb neurones bipolars sense mielina. Els cossos cel·lulars d'aquestes neurones formen el **gangli espiral**. Les prolongacions centrals de les cèl·lules del gangli formen la part coclear del **nervi vestibulococlear (nervi cranial VIII)** (Fig. 18 i 19).

### 2.2.3 Cèl·lules ciliades cocleares i la seva innervació

Les **cèl·lules ciliades** són els mecanoreceptors que constitueixen en gran part el neuroepiteli. S'anomenen així perquè a la seva part apical, en contacte amb l'endolimfa, tenen un centenar d'**estereocilis** col·locats en tres files de talles diferents. Els estereocilis poden descriure's com cilis no mòbils però flexibles que contenen filaments d'actina rodejats per varies isoformes de miosina. Tots els cilis sorgeixen d'una regió rígida d'actina densa, la **làmina cuticular**, que es troba a extrem apical de la cèl·lula. Les **unions en punta (tip links)** són ponts de glucoproteïnes o elastina que connecten la punta de l'estereocili més baix amb el cos de l'estereocili adjacent que és més alt (Flock, 1977; Lim, 1972; Pickles et al., 1984). Per tant, tots els cilis es troben units entre ells a través de ponts de proteïnes els quals intervenen directament en el mecanisme de transducció (Fettiplace, 2017). Aquestes cèl·lules es troben reposant sobre les cèl·lules de suport de la membrana basilar i es troben en contacte amb la membrana tectorial (Fig. 19). En els mamífers, una vegada sofreixen algun tipus de dany, no són reemplaçades.



Com s'ha dit, trobem dos tipus de cèl·lules sensorials que difereixen per la forma del cos cel·lular, per l'ordenació dels estereocilis i per la diferent connexió amb el SNC (Fig. I10).



**Figura I10.** Esquema d'una cèl·lula ciliada externa i una cèl·lula ciliada interna dins l'òrgan de Corti. Font: imatge adaptada de what-when-how

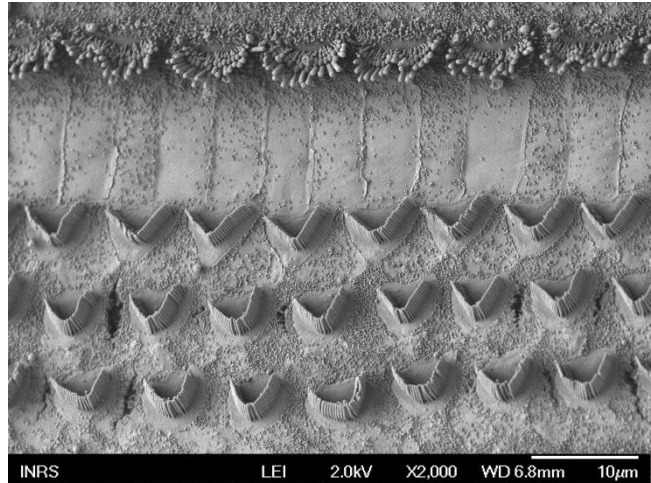
### 2.2.3.1 Cèl·lules ciliades internes

Les **CCI** tenen forma de pera i es recolzen sobre cèl·lules epitelials de suport (Fig. I10). Als humans, trobem unes 3.500 CCI disposades en una sola fila, amb els estereocilis ordenats en forma de palissada (Fig. I11). Com es veurà més endavant, aquestes cèl·lules són els veritables transductors neurosensorials ja que transformen les senyals mecàniques en senyals nervioses que es transmeten al cervell per les fibres del nervi auditiu i s'interpreten als centres auditius centrals.

Estan connectades a fibres bipolars de tipus I, les quals representen el 95 % de les **fibres aferents** del nervi auditiu i el neurotransmissor és el **glutamat**. Una CCI estableix contacte amb diversos botons terminals, cada un dels quals prové d'una neurona ganglionar diferent.

### 2.2.3.2 Cèl·lules ciliades externes

Les CCE tenen forma cilíndrica. Als humans, trobem unes 12.000 CCE disposades en tres files (CCE1, CCE2, CCE3). Igualment, cada CCE té tres files d'estereocilis col·locats en forma de W (Fig. I11), amb els cilis més llargs introduïts dins la membrana tectorial, la qual cosa crea una unió mecànica entre la membrana basilar i la tectorial (Fig. I10).



**Figura I11.** Imatge de la superfície de l'òrgan de Corti d'una rata on es mostra la organització dels estereocilis de les cèl·lules ciliades internes en palissada i externes en W.

Els estereocilis de les CCE presenten un gradient de longitud des de la base a l'àpex de la còclea. A la part apical, la longitud dels cilis és quatre vegades major que a la part basal. A més, els estereocilis de la base són més rígids que els de l'àpex. Aquestes variacions morfològiques fan que la resposta a les vibracions no sigui la mateixa al llarg de tota la còclea.

Les CCE poden variar de talla en resposta a un estímul elèctric, la qual cosa s'anomena **electromotilitat** (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986). Per portar a terme aquesta contracció presenten un reticle endoplasmàtic particular que cobreix tota la cara interna de les parets laterals de la cèl·lula. A més, aquestes parets estan reforçades per una xarxa de proteïnes contràctils com l'actina i l'espectrina que permet variar la talla (Carlisle et al., 1988; Tilney and Tilney, 1986). Una proteïna específica de les CCE és la prestina, que es troba al llarg de tot el cos cel·lular i té la capacitat de canviar de conformació segons el potencial de membrana (Ashmore et al., 2010).

Les CCE es troben innervades sobretot per terminacions del **sistema eferent** (90 %) les quals regulen les seves propietats mecàniques i el neurotransmissor és, principalment, l'**acetilcolina**. Per altra banda, també estan connectades al SNC a través de fibres aferents tipus II.

### 2.2.3.3 Innervació de les cèl·lules ciliades coclears

L'òrgan de Corti està innervat per tres tipus de **fibres nervioses**: **fibres auditives aferents**, **fibres auditives eferents (feix olivococlear)** i **fibres nervioses autònomes**.

Les **fibres auditives aferents** són cèl·lules bipolars, els cossos cel·lulars de les quals formen el gangli espiral. Els axons d'aquestes fibres composen el nervi auditiu que penetra en el crani pel meatus auditiu intern i arriba als centres auditius del SNC. En els humans, el nervi auditiu conté unes 35.000 fibres d'aquest tipus. S'han identificat dos tipus de fibres aferents: **fibres tipus I (bipolars)**, mielinitzades, amb cossos cel·lulars grans que formen el 95 % del nervi auditiu, i les **fibres tipus II (pseudomonopolars)**, sense mielina, amb cossos cel·lulars petits que formen el 5 % del nervi (Kiang et al., 1982; Simmons and Liberman, 1988a, 1988b). Les dendrites de les neurones de tipus I es creuen radialment fins arribar a les CCI, i les de tipus II, després d'un recorregut espiral, innerven les CCE. Per tant, aproximadament el 95 % de fibres aferents acaba sobre les CCI, i la resta sobre les CCE. Així doncs, les CCI aporten la majoria d'informació sobre les senyals acústiques al SNC. Cada neurona de tipus I connecta amb una sola CCI, però cada CCI associar-se amb unes 10-20 neurones. Contràriament, cada fibra aferent de tipus II innerva unes 10-20 CCE mitjançant sinapsis simètriques, les quals tenen molt poques vacuoles.

L'òrgan de Corti també està innervat per **fibres eferents**, la majoria de les quals finalitzen sobre les CCE (Simmons et al., 1990; Warr and Guinan, 1979). Aquestes eferents coclears s'originen en el **nucli olivar superior** del tronc encefàlic i s'anomenen **fibres olivococlears**. En els humans, trobem unes 500-600 fibres d'aquest tipus. Trobem dos fascicles olivococlears: **eferent lateral** i **eferent medial**, els quals posseeixen fibres directes (de nuclis olivars ipsolaterals) i creuades (contralaterals). Les fibres coclears eferents medials són llargues i amb mielina i poden controlar la longitud de les CCE. Les fibres laterals són petites i sense mielina i acaben sobre fibres coclears aferents (sinapsis axodendrítica), les quals poden ser inhibidores i col·laborar per millorar la discriminació de freqüències.

Finalment, les **fibres nervioses autònomes**, fibres adrenèrgiques, que innerven principalment els vasos sanguinis, també poden entrar en contacte amb les cèl·lules ciliades.

La **còclea de les rates** és innervada per unes 19.000 fibres nervioses, 79 % de les quals són fibres aferents i 21 % fibres eferents (Dannhof and Bruns, 1993).



## 2.2.4 El so

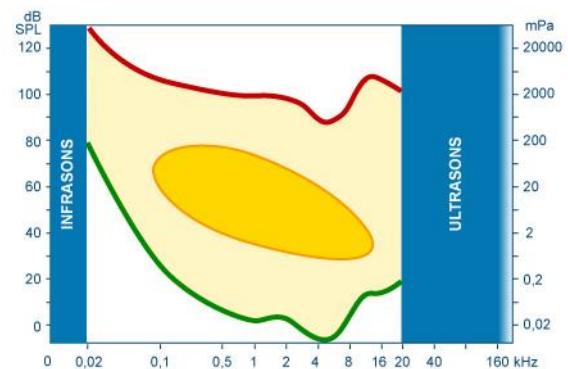
Una **ona sonora** és la propagació gradual de la vibració de molècules del medi al voltant de les seves posicions de repòs. Per tant, el **so** es produeix a causa del moviment de molècules d'aire que formen ones que viatgen cap a totes les direccions des de la seva font. Aquestes ones es caracteritzen per la seva **freqüència** (to: greu o agut) i **intensitat** (amplitud: feble o elevada). La freqüència del so es mesura en cicles per segon, o **hertz (Hz)**, i la intensitat es mesura en una escala logarítmica en unitats anomenades **decibels (dB)**. Així doncs, el so és la nostra interpretació de la freqüència, l'amplitud i la duració de les ones sonores que arriben a les nostres orelles. El sistema auditiu transforma les ones sonores en diferents patrons d'activitat neuronal, que després s'integren amb la informació que prové d'altres sistemes.

La ona acústica es propaga a diferents velocitats en funció de diferents característiques intrínseques del medi que travessa. Cada medi es caracteritza per una resistència al pas del so que s'anomena **impedància acústica**. Una part important de la ona sonora es reflexa quan aquesta entra en contacte amb un medi d'impedància alta.

El so es produeix de manera natural, i és una mescla de tons purs. Un to pur és un so d'una sola freqüència. El **soroll** és un so no desitjat.

L'oïda jove sana dels humans és sensible a estimulacions sonores amb freqüències entre 20 i 20.000 Hz. El llindar per la detecció d'un so pur varia a cada freqüència. Els llindars més baixos en l'audició humana es troben al voltant de 3.000 Hz (Fig. I12). Per tant, l'oïda humana és més sensible als sons que es troben al voltant de 1-3 kHz, però la seva sensibilitat disminueix a les altres freqüències, fent que es necessiti una major pressió acústica per arribar al llindar d'activació.

Quan envellim, els llindars a les altes freqüències augmenten, reduint, per tant, la percepció acústica (presbiacúsia). A més, després d'una llarga exposició a un so, s'aprecia l'augment del llindar d'audició a causa de la fatiga de les fibres nervioses, l'anomenada **fatiga auditiva**.

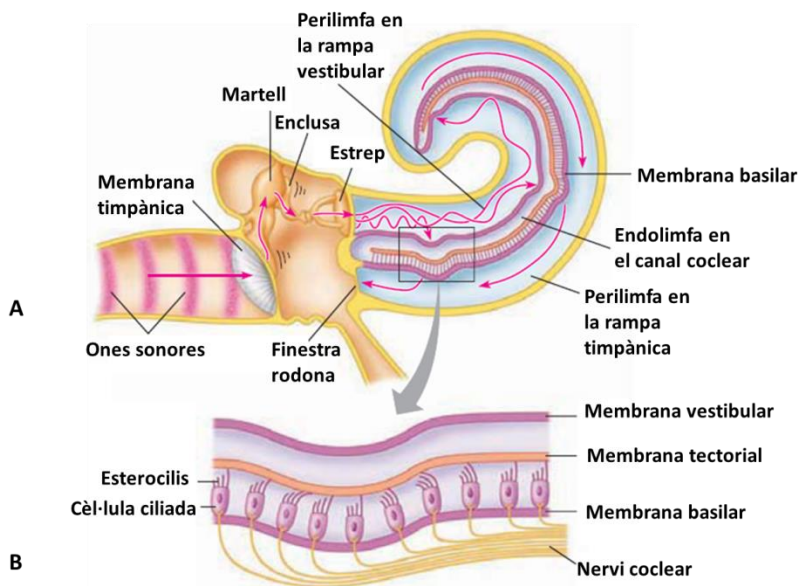


**Figura I12.** Camp auditiu humà i llindar d'audició.  
Font: imatge de *Voyage au centre de l'audition*.

### 2.2.5 Transducció del so

El so pot ser conduït cap a la còclea per dues vies diferents: per l'orella mitjana (membrana timpànica i cadena d'ossets) o a través de l'os.

L'**orella externa** capta les vibracions de l'aire que constitueix la senyal sonora i les condueix a través del canal auditiu extern fins a la membrana timpànica que les transforma en vibracions mecàniques (Fig. I13A). Aquestes vibracions travessen l'**orella mitjana** a través de la cadena d'ossets amplificant la senyal, fent que l'energia sonora de l'aire es transmeti de manera satisfactòria a la còclea plena de líquid de l'orella interna (Fig. I13A). L'**orella interna** és l'encarregada de transformar aquestes senyals mecàniques en senyals elèctriques que es dirigeixen al SNC (Fig. I13B).



**Figura I13.** Conducció de les ones sonores a través de l'orella. (A) Les ones sonores que entren a l'orella a través del pavelló auricular i el conducte auditiu extern, colpegen la membrana timpànica i la fan vibrar. Els ossets vibren en resposta al moviment del timpà i transmeten les vibracions a la finestra oval. La finestra oval vibra creant un moviment del líquid de la perilimfa de la còclea. (B) Les ones de la perilimfa provoquen el desplaçament de les membranes de l'òrgan de Corti. Quan les membranes oscil·len, els estereocilis de les cèl·lules ciliades s'inclinen, la qual cosa provoca l'alliberament del neurotransmissor al nervi coclear. El nervi coclear envia les senyals al SNC. Font: imatge adaptada de *Principios de Fisiología humana*. Stanfield.

Per tant, l'audició és un sentit complex que implica quatre **transduccions** diferents:

1. **Transducció acústic-mecànica:** l'energia que arriba de les ones sonores a través de l'aire es converteix en vibracions mecàniques a nivell de l'orella mitjana.
2. **Transducció hidro-mecànica:** les vibracions mecàniques es transformen en ones líquides dins l'orella interna.
3. **Transducció mecano-elèctrica:** el moviment de les ones es transforma en senyals químics a nivell de les cèl·lules ciliades.
4. **Transducció neurosensorial:** els senyals químics es transformen en potencials d'acció a nivell de les neurones sensorials.

### 2.2.5.1 Conducció del so per l'orella externa

La funció de l'orella externa és recol·lectar i amplificar les ones sonores. Els sons passen a través del **conducte auditiu**, on les ones esfèriques es transformen en ones planes, fins al timpà. Els canvis de pressió de la paret externa de la **membrana timpànica**, derivats de la senyal sonora, fan que aquesta vibri (Fig. I13A). Aquesta vibració es produeix a la mateixa freqüència i amplitud que la de les ones sonores.

El conducte auditiu, el pavelló auricular i el cap influeixen en la conducció del so. La influència d'aquestes estructures depèn de la freqüència, la direcció i la font del so. L'orella externa amplifica selectivament certes freqüències, juga un paper important en la localització de la font sonora, la qual es determina per la diferència de temps i intensitat en l'arribada del so en cada una de les orelles, i protegeix les estructures delicades de l'orella mitjana dels agents externs (Dancer, 1988).

### 2.2.5.2 Conducció del so per l'orella mitjana

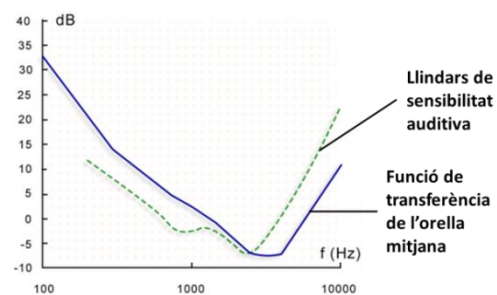
L'orella mitjana realitza tres funcions importants: transforma les ones acústiques en vibracions mecàniques, és l'adaptador d'impedància entre el medi aeri i el medi líquid i protegeix l'orella interna modulant la quantitat d'energia que rep modificant la rigidesa de la cadena timpano-ossicular.

La vibració del **timpà** es transmet al llarg de la **cadena d'ossets**, la qual funciona com un sistema de palanques que multiplica la vibració (amplificació). Quan l'estrep vibra, fa moure la membrana de la finestra oval a la qual està unit, creant ones als conductes plens de líquid de la còclea (Fig. I13A). Per tant, el timpà i la cadena d'ossets transformen les vibracions de l'aire en vibracions del líquid. L'amplificació del so es produeix tant a nivell de la cadena d'ossets, com també quan les ones sonores es transmeten des de la membrana timpànica, de gran diàmetre, a la finestra oval, molt més petita, creant una major pressió.

L'orella mitjana actua com a **transformador d'impedància**, millorant la transferència del so a l'orella interna (Dancer, 1988). La **impedància acústica** és la proporció entre la pressió sonora i la freqüència. Sense aquesta capacitat de l'orella mitjana gran part de l'energia acústica es perdria ja que, si les vibracions de l'aire s'apliquessin directament als líquids de l'orella interna, el 99,9 % de l'energia acústica es perdria perquè la impedància del líquid és molt més alta que la de l'aire. L'ajustament de la impedància en l'orella depèn de la relació de superfícies entre el timpà i la platina de l'estrep i la relació de palanques dels ossets. Aquest ajustament és suficient per augmentar l'eficàcia de transmissió d'energia prop de 30 dB. Aquest efecte és més pronunciat en baixes freqüències.

Quan es donen estimulacions acústiques de gran intensitat, el **múscul tensor del timpà** i el **múscul estapedial** es contreuen, disminuint la quantitat d'energia entregada a l'orella interna i, per tant, protegint-la. Aquests reflexos s'explicaran més endavant.

Les funcions de transfert de l'orella externa i mitjana són les que "creen" la corba dels llindars de sensibilitat auditiva (Fig. I14). L'orella interna té un llindar de detecció constant en casi tot el rang d'audició.



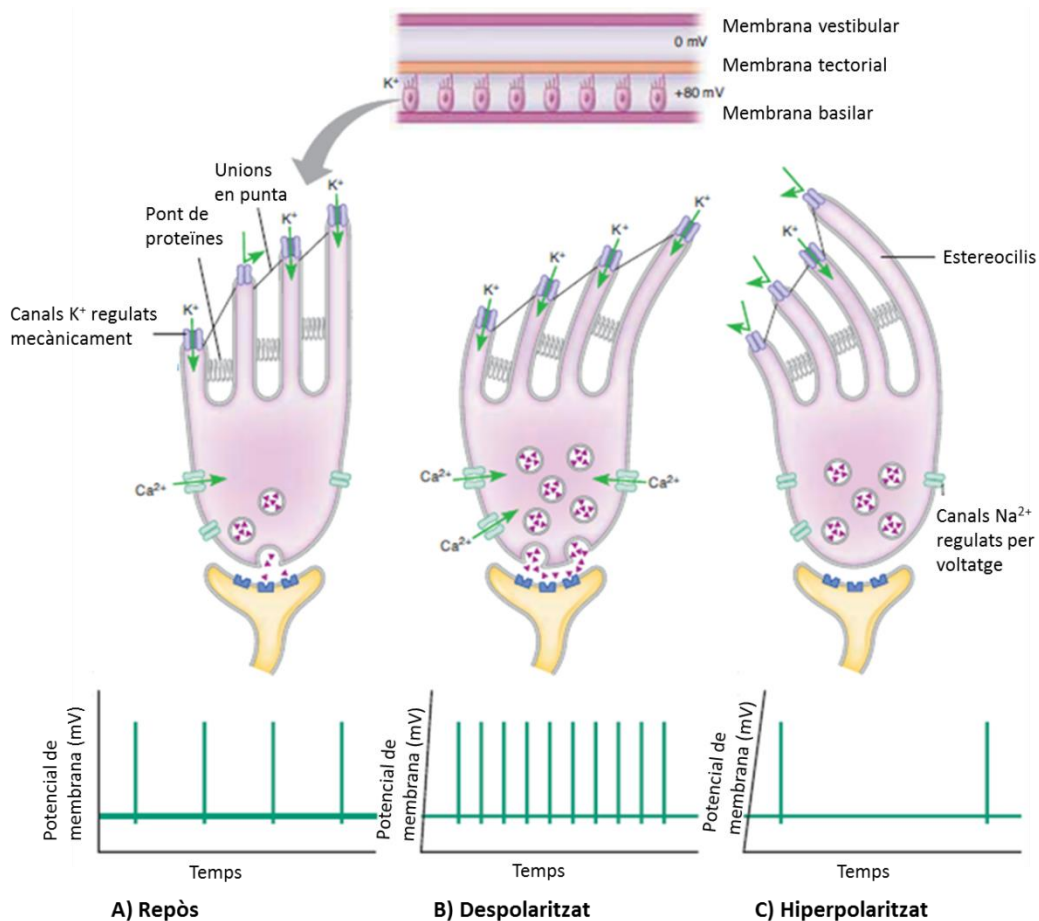
**Figura I14.** Llindars de sensibilitat auditiva.  
Font: imatge adaptada de *Voyage au centre de l'audition*.

### 2.2.5.3 Conducció del so per l'orella interna

L'orella interna representa l'etapa final del processament mecànic del so i porta a terme tres funcions bàsiques: filtrat de la senyal sonora, transducció i generació d'impulsos nerviosos.

El so propagat a través de l'orella externa i mitjana arriba a la còclea a través de les vibracions de la finestra oval, la qual crea una diferència de pressió entre la rampa vestibular i timpànica. Aquesta diferència de pressió genera desplaçaments de la **membrana basilar** i de totes les estructures que aquesta suporta (Fig. I13B). A causa del desplaçament d'aquesta membrana, els cilis de les **cèl·lules ciliades** es dobleguen. Aquest moviment fa que s'alliberi glutamat a l'escletxa sinàptica, creant potencials d'acció sobre les terminacions post-sinàptiques que envien la informació sobre el so a través del nervi auditiu fins al cervell. Per tant, el senyal acústic es transforma en missatge nerviós a nivell de l'orella interna, a nivell de la **còclea**.

La **transducció mecano-elèctrica** es produeix als estereocilis de les cèl·lules sensorials, els quals transformen la vibració del so en un missatge nerviós. El pol apical de les cèl·lules ciliades es troba immers dins endolimfa, rica en K<sup>+</sup>. El potencial de repòs de la cèl·lula és de -60 mV, la qual cosa afavoreix l'entrada d'aquest ió de manera passiva (Fig. I15A). Això fa que hi hagi un estalvi important d'adenosina-5'-trifosfat (ATP) en les cèl·lules ciliades. Segons la direcció en que s'inclinin els estereocilis, els canals de potassi ubicats en la part superior dels cilis s'obren o es tanquen. Les unions proteiques que trobem entre els estereocilis permeten l'obertura dels canals, deixant que el K<sup>+</sup> entri dins la cèl·lula per gradient electroquímic, la qual cosa provoca una despolarització (Fig. I15B). Contràriament, el tancament dels canals evita que el K<sup>+</sup> passi, provocant una hiperpolarització (Fig. I15C).

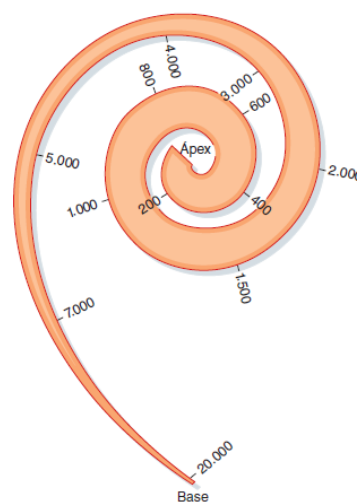


**Figura I15.** Funcions dels estereocilis en la transducció del so realitzada per les cèl·lules ciliades. (A) Els canals de potassi dels estereocilis, regulats de manera mecànica, es troben parcialment oberts quan la cèl·lula està en repòs (estereocilis rectes) i els K<sup>+</sup> entren dins la cèl·lula, la qual cosa produeix una despolarització que resulta suficient per alliberar el neurotransmissor que comunica amb la neurona aferent; el resultat és una baixa freqüència de potencials d'acció. (B) Quan els estereocilis s'inclinen cap al cili més alt, els canals s'obren més i més K<sup>+</sup> entren dins la cèl·lula, la qual cosa produeix una major despolarització i una major freqüència de potencials d'acció a la neurona aferent. (C) Quan els estereocilis s'inclinen allunyant-se del cili més alt, els canals de potassi es tanquen i poc K<sup>+</sup> entra a la cèl·lula, la qual cosa fa que els potencials d'acció de la neurona aferent disminueixin. Font: imatge adaptada de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

L'ona generada a la base de la còclea es propaga de manera passiva cap a l'àpex. La posició on trobem l'amplitud màxima de la vibració de la membrana basilar varia en funció de la **frequència característica**, freqüència en la qual la resposta d'una fibra aferent és màxima, o, en altres termes, freqüència en la qual amb una intensitat mínima es genera un potencial. La mecànica coclear ha estat explicada per dues grans teories: la **teoria de la ressonància (von Helmholtz)** i la **teoria de l'ona propagada (von Békésy)**.

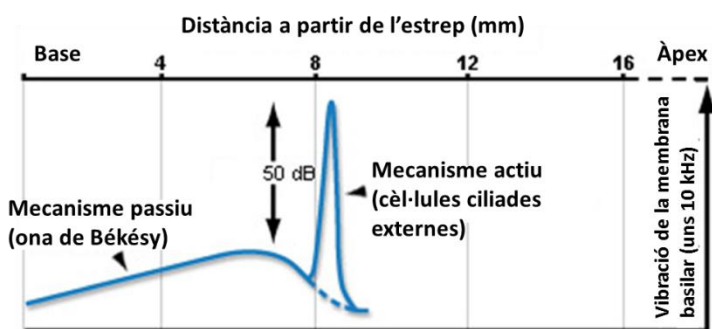
**Von Helmholtz** va proposar que la membrana basilar estava composta d'unitats independents, de longitud i gruix específics, cada una de les quals ressonava en una freqüència concreta.

**Georg von Békésy** (premi Nobel de Fisiologia i Medicina en 1961) va portar a terme la prova experimental que demostrava que la còclea estava implicada en l'anàlisi de freqüència dels sons. Va provar que cada punt al llarg de la membrana basilar s'encarrega de la transducció d'una freqüència concreta, ja que cada freqüència produeix vibracions màximes en una regió concreta de la membrana. Les altes freqüències es discriminen a la base de la còclea, mentre que les baixes ho fan a l'àpex (Fig. I16). Aquesta localització específica de les freqüències sobre la membrana basilar s'anomena **tonotopicitat freqüencial**. L'ona creada pel so al llarg de la paret coclear és un fenomen de ressonància passiu, anomenat **ona de Békésy** (von Békésy, 1960).



**Figura I16.** Disseny del mapa tonotòpic de la còclea. Font: imatge adaptada de Berne y Levy. Fisiologia. Levy, Koeppen and Stanton.

Així i tot, aquest mecanisme passiu no és suficient per explicar la finesa de l'anàlisi freqüencial del senyal acústic en les altes freqüències. **Fenòmens actius**, depenents de la motilitat de les **CCE**, milloren considerablement el resultat de la tonotopicitat (Fig. I17).



**Figura I17.** Vibració de la membrana basilar pels dos mecanismes que es porten a terme; mecanisme passiu i actiu. Font: imatge adaptada de Voyage au centre de l'audition.



Les CCE no es desplacen pels moviments de la membrana basilar ja que es troben fixades a la membrana tectorial a través dels estereocilis més llargs, establint una unió mecànica entre la membrana basilar i la tectorial. Per conseqüent, el desplaçament entre ambdues membranes dóna lloc a un moviment de cisallament dels estereocilis la qual cosa modifica el potencial de membrana (Cody and Russell, 1985). Les variacions elèctriques que acompanyen les vibracions de les CCE s'anomenen **potencial microfònic coclear**, i són el suport elèctric del **fenomen actiu ràpid** (Hackney and Furness, 1995). Les variacions de potencial donen lloc a la contracció de la prestina, una proteïna situada al llarg de la membrana plasmàtica, portant a terme una sèrie de contraccions ràpides i successives (Frolenkov et al., 1998; Guinan et al., 2012). L'**electromotricitat** de les CCE és un mecanisme ràpid i no depenent d'energia. Aquesta amplificació de la vibració de la membrana es dóna a les freqüències properes a la freqüència característica (Kachar et al., 1986). Per un so pur, el mecanisme actiu amplifica la vibració d'una part molt estreta de la membrana basilar fent que dues freqüències veïnes puguin ser ben discriminades (Fig. I17).

El fenomen actiu ràpid és completat per un **fenomen actiu lent** que implica les vies nervioses eferents del sistema colinèrgic (Bonfils et al., 1986; Warr and Guinan, 1979). Aquest fenomen consisteix en alliberar acetilcolina que impacte sobre les propietats mecàniques de les CCE i, per tant, les propietats mecàniques de la membrana basilar. És un procés lent i depenent d'energia. Per tant, el SNC té la possibilitat d'ajustar a nivell perifèric el funcionament del receptor auditiu, concretament, la sensibilitat i selectivitat de la freqüència.

En resum, les CCE porten a terme una transducció inversa (electro-mecànica) que permet reenviar energia per augmentar la sensibilitat i selectivitat freqüencial. Així doncs, les CCE actuen com un **amplificador coclear** ja que modulen el comportament mecànic de les estructures cocleares (Davis, 1983). Una lesió o una fatiga d'aquestes cèl·lules es tradueix en una pèrdua dels mecanismes actius d'amplificació i una augmentació del llindar de detecció del so.

Aquesta augmentació local de l'amplitud dels moviments de vibració permeten la suficient inclinació dels estereocilis de les **CCI** corresponents. La flexió dels cilis donarà lloc a una despolarització de la cèl·lula proporcional a l'amplitud de vibració, fent que l'activitat de les neurones augmenti en proporció a la intensitat sonora. Les CCI es despolaritzen i, a causa de l'entrada massiva de K<sup>+</sup>, es porta a terme l'entrada de Ca<sup>2+</sup> a través dels canals de calci, la

qual cosa provoca la exocitosis de les vesícules que contenen glutamat. Per tant, les CCI són les encarregades de la **transducció mecano-elèctrica** del missatge auditiu (Deol and Gluecksohn-Waelsch, 1979). Aquest neurotransmissor excitador ràpid inicia llavors l'etapa de **transducció neurosensorial**, desencadenant un tren de **potencials d'acció** que estableixen el flux nerviós aferent. El flux nerviós es transmet a través de la neurona auditiva aferent del nervi cranial VIII fins a les estructures auditives centrals.

L'orella, a més de transformar els sons en un missatge auditiu, és capaç d'emetre sons en resposta a una emissió acústica, les **oto-emissions**. Aquestes emissions neixen de l'orella interna, on els moviments dels líquids es transmeten a la platina de l'estrep, als ossets i, finalment al timpà que vibra emetent un so (Kemp, 1978). Així es demostra que l'orella interna, considerada com un **receptor passiu**, també pot comportar-se com un **receptor actiu** productor d'energia sonora.

## 2.2.6 Vies auditives centrals

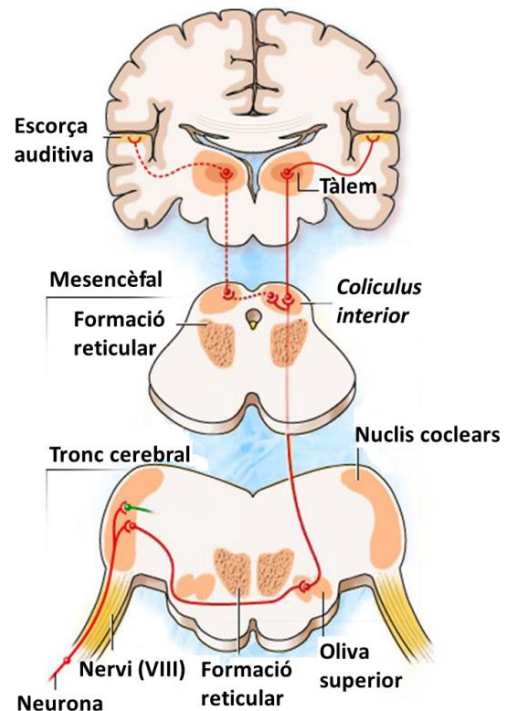
La audició, com totes les modalitats sensorials, conté unes vies ascendents i descendents, i uns centres nerviosos sobre els quals arriba la informació perifèrica.

Troblem dos tipus de **vies ascendents**: la **via primària (via clàssica)**, la qual es dedica sols a la funció d'audició, i la **via no primària (via “no-clàssica”)**, sobre la qual convergeixen altres modalitats sensorials. La integritat i el bon funcionament d'ambdues vies són necessaris per la percepció del so.

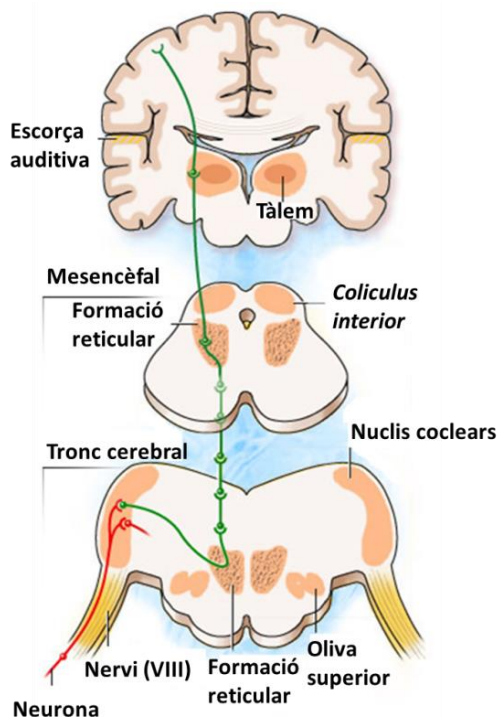
La **via primària** és una via curta, ràpida, ja que està composta per fibres mielíniques, i acaba a l'escorça auditiva primària (Fig. I18). A cada un dels nivells de la via es realitza una activitat específica de descodificació i interpretació del missatge auditiu que es transmet als nivells superiors.



La primera etapa de la via auditiva primària està constituïda pels **nuclis coclears** que es troben al tronc cerebral, els quals reben els axons de les neurones ganglionars de tipus I del **gangli espiral**. En aquest nivell s'analitza la duració, la intensitat i la freqüència del so. Un altre nivell del tronc cerebral és el **complex olivar superior (COS)**, on la majoria de fibres auditives fan sinapsis després de creuar la línia medial. A continuació, el missatge arriba al mesencèfal, concretament al **coliculus interior** que porta a terme un paper essencial en la localització del so. El darrer pas abans d'arribar a l'escorça auditiva es porta a terme al **tàlem**, al **cos geniculat medial** on es produeix la preparació d'una resposta motora. La darrera neurona de la via auditiva uneix el tàlem a l'**escorça auditiva primària** (àrees 41 i 42), on el missatge auditiu, amplament descodificat, pot ser integrat.



**Figura 118.** Via auditiva ascendente primària. Font: imatge adaptada de Voyage au centre de l'audition.



**Figura 119.** Via auditiva ascendente no primària. Font: imatge adaptada de Voyage au centre de l'audition.

El paper de la **via “no primària”** és la selecció de la informació que s'ha de processar en prioritat.

El primer relleu, comú a la via primària, està format pels **nuclis coclears**. Des d'aquests nuclis, les fibres s'uneixen a la via reticular ascendente. Després de la **formació reticular**, la via no primària condueix al **tàlem**, i finalment a l'**escorça multisensorial** (Fig. 119). També s'estableixen connexions amb l'**hipotàlem** i els **centres vegetatius**. En aquesta via, la informació auditiva s'integra amb altres modalitats sensorials.

Les **vies descendents** envien informació des de l'escorça cap al receptor perifèric, passant per diversos nuclis. L'escorça projecta sobre el **cos geniculat medial** i el *coliculus interior*. Les neurones del *coliculus interior* projecten bilateralment al **COS** i als **nuclis coclears**. El feix olivococlear, procedent dels nuclis de la oliva superior, es projecta cap a les **cèl·lules ciliades** de l'òrgan de Corti i modula el procés de transducció. Els nuclis motors dels nervis V i VII envien projeccions d'axons cap als **músculs tensor del timpà i estapedial**, respectivament, els quals amortitzen el moviment dels ossets quan trobem sons intensos.

### 2.2.6.1 Tronc cerebral

El **tronc cerebral** serveix per establir la comunicació entre la medulla espinal, el cerebel i el cervell. En el tronc cerebral es troben diversos nuclis de la via auditiva: els **nuclis coclears**, el **complex olivar superior**, el *lemniscus lateral* i el seu nucli, i el *coliculus interior*.

El **nervi auditiu** passa a través del conducte auditiu intern fins arribar als **nuclis coclears**. Els nuclis coclears s'organitzen en dues regions: nucli coclear dorsal (NCD) i nucli coclear ventral (NCV). Morfològicament, aquests nuclis tenen una gran diversitat de tipus cel·lulars. Les fibres del nervi, quan entren als nuclis coclears, es disposen de manera ordenada i tonotòpica; les de la base coclear (freqüències agudes) arriben a regions profundes, mentre que les que provenen de l'àpex es queden en la superfície.

Els nuclis coclears analitzen la intensitat del so (feble o elevat), diferents paràmetres temporals com la duració del so (curt o llarg), i mantenen i transmeten l'anàlisi freqüencial (so greu o agut). Algunes neurones d'aquests nuclis projecten les seves fibres cap a altres nuclis, les anomenades estries acústiques. Les altres neurones envien els axons de manera directa al COS o al *coliculus interior* del mesencèfal.

El **COS** és una de les estructures més complexes de la via auditiva i el primer punt en el qual conflueix la informació d'ambdues orelles. Està constituït per varis nuclis simètrics a ambdós costats de la línia medial, formant una intensa xarxa neuronal amb nombroses projeccions.

El COS és un gran centre d'integració i regulació de la informació auditiva capaç de localitzar el lloc d'origen del so, i, a més, realitza funcions reflexes molt rellevants per a la protecció del sistema. Els axons del COS passen pel *lemniscus lateral* per arribar al *coliculus interior*.

Les projeccions ascendents provinents del COS circulen pel fascicle del *lemniscus lateral* i arriben a les neurones dels nuclis situats en el *lemniscus* i al *coliculus interior*.

El nucli del *lemniscus lateral* està constituït per varis grups de neurones que s'organitzen en dues regions: el complex ventral, implicat en l'anàlisi de la duració d'un so complex, i el dorsal. El *coliculus interior* està situat al sostre del mesencèfal i també està format per dues parts: l'escorça dorsal i externa, implicades en l'anàlisi d'informació auditiva complexa i en la identificació de sons nous, i el nucli central que participa en l'anàlisi freqüencial del so i en les diferències d'intensitat i temps. L'activitat de les neurones del *coliculus interior* es troba controlada per fibres descendents de l'escorça i del tàlem. Aquestes neurones envien els axons al cos geniculat medial del tàlem.

#### 2.2.6.2 Tàlem i escorça auditiva

El **tàlem auditiu**, l'anomenat **cos geniculat**, és una estructura composta per varis nuclis. Les fibres ascendents que envien les neurones del *coliculus interior* arriben a les del **cos geniculat medial** ipsolateral de manera directa. El cos geniculat medial dels mamífers està dividit en tres zones principals: zona dorsal, zona medial i zona ventral, la qual participa en l'anàlisi freqüencial dels missatges auditius i està organitzada tonotòpicament. Les seves neurones transmeten les seves projeccions ascendents a l'escorça auditiva primària.

L'**escorça auditiva** en l'ésser humà constitueix el 8 % del total de la superfície de l'escorça cerebral i està subdividida en més d'una dotzena de camps auditius. Es localitza en la superfície dorsal del lòbul temporal. Les neurones d'aquesta escorça reben contactes d'ambdós costats del cos geniculat. Cada neurona del cos geniculat que es projecta a l'escorça genera un arbre de fibres que es ramifica donant lloc a una amplificació del senyal.

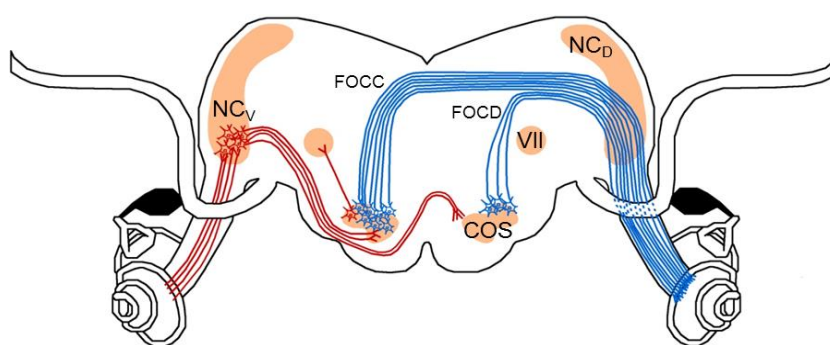
Clàssicament es defineixen dos tipus de regions funcionals en l'escorça auditiva: l'**escorça auditiva primària**, la **AI** (àrees 41 i 42 de Brodmann), formada per neurones organitzades tonotòpidament i relacionada amb l'anàlisi freqüencial, i l'**escorça auditiva secundària**, **AII**, que té un paper funcional molt important per la localització espacial del so i l'anàlisi de sons complexos. La regió que rodeja ambdues àrees serveix per l'anàlisi i integració de l'audició amb la resta de sistemes sensorials.

## 2.2.7 Reflexos auditius

Un so d'alta intensitat pot arribar a provocar lesions irreversibles al receptor auditiu. Per evitar això, el sistema auditiu utilitza dos arcs reflexos de protecció per tal de regular la intensitat sonora. Trobem dos tipus de reflexos ben identificats: el **reflex de l'orella mitjana (ROM)** i el **reflex de l'orella interna (ROI)** o **reflex olivo-coclear**. Aquests dos reflexos són bilaterals i provocats per una estimulació sonora ipsilateral i/o contralateral. El ROM té la funció de protegir la còclea dels sorolls de fortes intensitats, mentre que el ROI millora el processament del senyal acústic per lluitar contra el so d'emascarament en ambients sorollosos (Liberman and Guinan, 1998).

### 2.2.7.1 Reflex de l'orella interna

El sistema olivo-coclear està compost per dues poblacions de neurones; les **neurones del sistema olivo-coclear lateral** que provenen de l'oliva superior lateral i es projecten sobre les fibres de tipus I situades a nivell de les CCI (projecció ipsilateral), i les **neurones del sistema olivo-coclear medial** que provenen majoritàriament del nucli central del cos trapezoïdal i es connecten directament a les CCE (projecció bilateral) (Fig. I20).



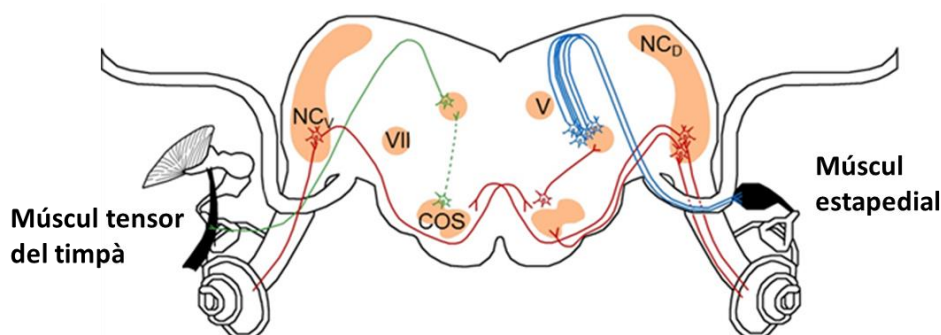
**Figura I20.** Vies nervioses del reflex olivo-coclear. Les vies aferents són les línies vermelles, les línies eferents les blaves. NC<sub>D</sub>: nucli coclear dorsal; NC<sub>V</sub>: nucli coclear ventral; COS: complex olivar superior; VII: nucli del nervi facial; FOCC: fibres olivo-cocleares creuades; FOCD: fibres olivo-cocleares directes. Font: INRS.

L'activació del ROI provoca modificacions de conformitat a l'òrgan de Corti ja que modifica la configuració de les CCE, permetent ajustar el guany de l'amplificador coclear a la freqüència característica. Això fa que la ressonància de les CCE augmenti i, per tant, el llindar d'estimulació de la fibra aferent disminueix.

### 2.2.7.2 Reflex de l'orella mitjana

El ROM es manifesta per la contracció de dos músculs situats dins la cavitat de l'orella mitjana: el **múscul estapedial**, inserit a l'estrep, i el **múscul tensor del timpà**, inserit al martell (Fig. I21). En els humans, el múscul estapedial és l'únic implicat en el ROM, en canvi, en les rates, els dos músculs participen en aquest reflex de manera equivalent (van den Berge et al., 1990). La contracció del múscul tensor del timpà permet, com bé indica el seu nom, tensar la membrana timpànica, en canvi, la contracció del múscul estapedial disminueix els moviments de l'estrep, la qual cosa limita la pressió de la platina de l'estrep a la finestra oval (Borg et al., 1984). Així doncs, ambdues contraccions permeten disminuir l'energia de la vibració transmesa a la còclea. L'activació d'aquest reflex depèn de la freqüència del so; en les rates, el ROM actua en freqüències inferiors a 10 kHz, amb una eficàcia màxima a 1.000 Hz (Liberman and Guinan, 1998; Pilz et al., 1997).

La via neural aferent de l'arc reflex implicat en el ROM utilitza les neurones auditives primàries fins als nuclis coclears ventrals (Fig. I21). Les vies connectades al tensor del timpà s'originen a nivell del nucli motor del nervi trigeminat, les connexions entre la via aferent i eferent no es coneixen prou bé, però sembla que són connexions directes i creuades (Billig et al., 2007). La via eferent del reflex estapedial utilitza les neurones que s'originen al voltant del nucli del nervi VII. Les connexions entre les vies aferent i eferent es porten a terme també de manera directa i creuada, a través de les interneurons que connecten el COS (Borg, 1973; Venet et al., 2011). Les projeccions creuades de les dues vies eferents permeten una activació bilateral del ROM en resposta a una estimulació ipsilateral i/o contralateral de forta intensitat (al voltant de 80 dB en els éssers humans).



**Figura I21.** Esquema de les vies nervioses del reflex de l'orella mitjana. Les vies aferents són les línies vermelles, les vies eferents que innerven el múscul estapedial són blaves i les vies eferents específiques al múscul tensor del timpà són línies contínues verdes. La línia verda en punts esquematitza les connexions nervioses entre les vies aferents i eferents del múscul tensor del timpà, però, actualment, encara no es troben ben identificades. NC<sub>d</sub>: nucli coclear dorsal; NC<sub>v</sub>: nucli coclear ventral; COS: complex olivar superior; V: nucli motor del nervi trigeminat; VII: nucli del nervi facial. Font: INRS.

Independentment del mètode de mesura utilitzat, és difícil diferenciar els efectes del múscul estapedial i del múscul tensor del timpà que participen en el ROM. De fet, els seus temps de latència són ràpids i molt pròxims; de 10 a 20 ms per les intensitats mitjanes i de 6 a 10 ms per les intensitats entre 110 i 120 dB en rates (Pilz et al., 1997; van den Berge et al., 1990). A més, aquests músculs tenen una alta resistència a la fatiga i estan principalment innervats per fibres ràpides (van den Berge and van der Wal, 1990; van den Berge and Wirtz, 1989a, 1989b). Aquestes particularitats assignen al ROM un important paper dins la protecció de la còclea particularment eficaç contra els danys causats pel soroll de forta intensitat.

### 2.2.8 Disfunció auditiva

L'audició és una funció neurosensorial que pot quedar afectada de diferents formes. Aproximadament el 12 % de la població presenta una disminució de l'audició al llarg de la seva vida, la qual cosa representa, en alguns casos, una discapacitat important.

Nombrosos factors poden provocar **sordesa** o disminució de l'agudesia auditiva. Pot ser d'origen genètic, epigenètic o adquirida al llarg de la vida (traumatisme acústic, infecció, medicaments ototòxics, solvents ototòxics, envelliment...).

Trobem diferents tipus de sordesa:

- La **sordesa de transmissió** (o conducció) correspon a patologies que afecten a l'orella externa i mitjana, on la transmissió de les ones sonores cap a la finestra oval es troba alterada. Aquesta pèrdua pot tenir diferents causes; el conducte auditiu tapat amb cera o líquid, una infecció de l'orella mitjana (otitis) o una otosclerosi, entre altres.
- La **sordesa neurosensorial** es produeix per una patologia de la còclea, del nervi auditiu o de l'escorça auditiva. En general és conseqüència d'una lesió de la còclea per sons d'elevada intensitat o substàncies ototòxiques, donant lloc a la pèrdua de cèl·lules ciliades. La pèrdua d'aquestes cèl·lules o neurones pot ser l'origen també de l'aparició d'**acúfens (tinnitus)**. L'acufèn és una percepció auditiva en absència d'un estímul extern, la qual cosa tendeix a emascarar els sons que arriben a l'orella, deteriorant l'audició del pacient.
- La **sordesa central** és el resultat d'una lesió en les vies auditives centrals, on la transmissió dels impulsos nerviosos entre l'orella i l'escorça cerebral es troba alterada.



### 2.2.8.1 Presbiacúsia

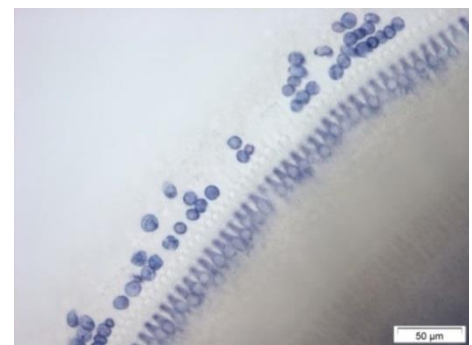
Es defineix la presbiacúsia com l'envelliment “normal” de l'oïda, és, per tant, la pèrdua auditiva associada a l'edat. De totes les funcions sensorials, l'audició és una de les que presenta un envelliment més pronunciat. Aquest deteriorament relacionat amb l'edat comença després dels 20 anys, quan la capacitat per sentir freqüències altes disminueix.

És una patologia complexa i multifactorial ja que intervenen molts factors diferents, tant individuals (edat, genètica...) com ambientals (exposició al soroll, medicació...). Des del punt de vista fisiopatològic es caracteritza per la degeneració de l'òrgan de Corti, i/o del gangli espiral, i/o de l'estria vascular.

### 2.2.8.2 Medicaments i solvents ototòxics

Certs medicaments presenten una ototoxicitat dosis-depenent, on les cèl·lules ciliades esdevenen la diana primària de destrucció. També causen ototoxicitat coclear una sèrie de productes químics d'exposició laboral (Campo et al., 2013) (Fig. I22).

La severitat amb la qual les cèl·lules es veuen afectades progressa segons un doble gradient: des de la primera a la tercera fila de CCE, les CCI són atacades al final (Fee, 1980), i la progressió es desenvolupa principalment des de la base fins a l'àpex de la còclea. Les cèl·lules ciliades intoxicades moren principalment per apoptosi. La desaparició d'aquestes cèl·lules està acompanyada per una resposta de les cèl·lules del sistema immune, caracteritzada per una invasió massiva de macròfags a l'òrgan de Corti.



**Figura I22.** Pèrdua de cèl·lules ciliades externes després d'una exposició a 1200 ppm d'estirè. Font: INRS.

Quan es destrueixen les CCI, els elements nerviosos de la còclea també es veuen afectats. Una degeneració progressiva arribarà a les neurones ganglionars de tipus I. Aquesta degeneració comença amb les terminacions no mielinitzades situades davall de les CCI, que sofreixen un xoc excitotòxic en el moment en que aquestes cèl·lules moren. A continuació s'observa una degeneració axoplàsmica de les fibres i, finalment, la mort de les neurones ganglionars.

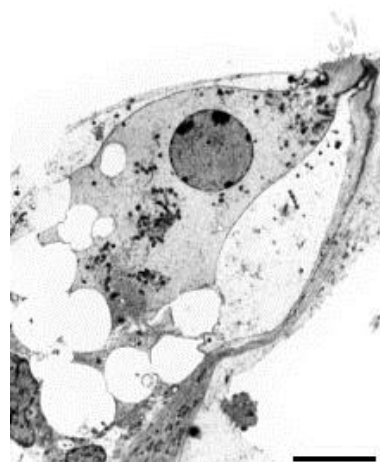
### 2.2.8.3 Traumatisme acústic

L'exposició al soroll pot danyar l'orella interna i provocar una pèrdua auditiva neurosensorial. En funció de la duració de l'exposició i la intensitat, l'estimulació sonora pot danyar les estructures de l'òrgan de Corti i causar la pèrdua auditiva temporal o permanent. La localització del dany depèn de la freqüència del so. La diana del traumatisme acústic és doble, per un costat, les CCE, i per altra banda, les terminacions del nervi auditiu de les CCI. Aquestes estructures es veuen implicades de manera diferent i la seva capacitat per ser reparades depèn del tipus de soroll.

### 2.2.8.4 Excitotoxicitat

La principal responsable de la patologia neuronal en l'òrgan de Corti és l'excitotoxicitat vinculada al glutamat. Es produeix, sobretot, en dues situacions: accident isquèmic local o trauma acústic de llarga durada (Fig. I23).

Després d'un xoc excitotòxic trobem una reparació sinàptica ja que, poc temps després de la lesió es produeix una regeneració de les terminacions dendrítiques per tornar a connectar amb la CCI. En els éssers humans, aquest mecanisme podria ser el responsable de la recuperació espontània que es produeix després d'una sordesa súbbita isquèmica o traumàtica. S'ha de tenir en compte que aquesta regeneració es dona amb el primer xoc excitotòxic, en lesions reiteratives s'arriba a alterar la capacitat de regeneració sinàptica o es provoca la mort neuronal.



**Figura I23.** Inflament de les aferents sinàptiques davall una cèl·lula ciliada interna per un excés d'alliberació de glutamat després de l'exposició a un soroll. Escala: 10 µm. Font: imatge de R Pujol de Voyage au centre de l'audition.

En un moment puntual, l'excés de soroll, provoca un alliberament excessiu de glutamat, provocant l'inflament i la subseqüent explosió del botó post-sinàptic (excitotoxicitat) (Fig. I23). Podem trobar-hi una reparació sinàptica, resultant en la recuperació funcional. En el cas d'un traumatisme sever o repetit, les CCI són malmeses i desapareixen, generalment per apoptosi (Nicotera et al., 2003; Ping Yang et al., 2004).



#### **2.2.8.5 Possibles tractaments**

Un dels objectius principals de la recerca dins l'àrea acústica és entendre les diferències entre les **lesions coclears reversibles i irreversibles** (Liberman and Dodds, 1987).

És possible ajudar a les persones que pateixen **sordesa de transmissió** amb auxiliars auditius, és a dir, dispositius que amplifiquen el so i condueixen les ones sonores a través de l'os cap a l'orella interna.

Per altra banda, trobem pocs tractaments eficaços per la **pèrdua auditiva causada per patologies de la còclea o el sistema nerviós**. Aquests pacients poden ser ajudats per audiòfons o implants coclears, encara que el funcionament perfecte de l'òrgan sensorial no pot ser íntegrament restituit, en el millor dels casos s'optimitza la funció auditiva que roman. L'implant coclear és un dispositiu que transforma la informació acústica auditiva en senyals elèctriques que estimulen directament el nervi auditiu. La regeneració de cèl·lules ciliades encara no s'ha portat a terme, però grans esforços en recerca es dediquen actualment a aquesta tasca.

*“Sentir és preciós pel qui escolta”*

*Proverbi egipci*

## 2.3 Sistema vestibular

L'**equilibri** és l'estat d'estabilitat, és la funció neurosensorial que regeix les relacions amb el món físic i permet assegurar i adaptar tots els moviments de manera eficaç. L'equilibri implica la comunicació entre el **sistema vestibular**, el **sistema visual** i el **sistema propioceptiu**. L'equilibri resulta, per tant, de la integració de les tres fonts d'informació, la qual cosa fa que una desavinença entre aquests doni lloc a diversos problemes.

El **sistema vestibular** és l'òrgan sensorial específic, però no exclusiu, de la funció d'equilibri. Està format per tres components: l'**aparell sensorial perifèric**, un **processador central** i un **mecanisme efector**. L'aparell perifèric consisteix en un grup de sensors que envien al SNC informació sobre la velocitat angular i l'acceleració lineal del cap. El SNC processa aquestes senyals i les combina amb altres informacions sensorials per estimar l'orientació de l'individu en l'espai. El sistema vestibular central respon a través de reflexos que involucren els músculs oculars i la medul·la espinal. Aquest sistema és, per tant, un component essencial en la producció de respostes motores essencials pel funcionament diari i la supervivència.

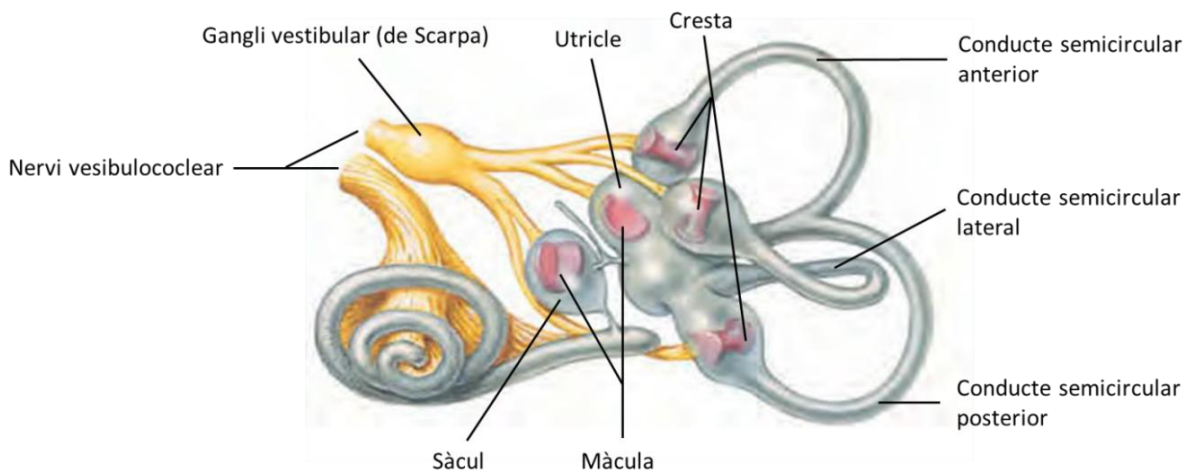
Així doncs, el sistema vestibular té funcions sensibles importants que contribueixen a la percepció del propi moviment, la posició del cap i l'orientació espacial en relació a la gravetat, també compleix funcions motores que ajuden a estabilitzar la mirada, el cap i la postura del cos. Avui en dia, molts estudis parlen també del paper del sistema vestibular en els processos cognitius com la memòria i la navegació espacial (Hitier et al., 2014; Rancz et al., 2015).

La majoria de l'activitat vestibular es dona de manera involuntària, per tant, no s'acostuma a ser conscient de la presència d'aquest sistema quan funciona amb normalitat. No obstant, quan la seva tasca es veu afectada, es donen sensacions desagradables i marejos que es solen associar a vertígens i nàusees, juntament amb una sensació de pèrdua d'equilibri, moviments oculars incontrolables, dificultats amb la visió durant el moviment i pèrdua del sentit de l'orientació en l'espai. Clínicament, s'avaluen els moviments de l'ull i certes postures dinàmiques o estàtiques per examinar l'estat funcional dels sensors vestibulars (Jones et al., 2009).

### 2.3.1 Laberint vestibular perifèric

El sistema perifèric vestibular està present en tots els vertebrats i es troba dins l'os temporal, a l'orella interna (Fig. I5). Consisteix, com la còclea, en un component del **laberint membranós** englobat pel **laberint ossi**.

Igual que en la còclea, entre el laberint membranós i ossi trobem un espai que conté la **perilimfa**, la composició de la qual és un baix contingut de K<sup>+</sup> (uns 7 mM) i alt contingut de Na<sup>+</sup> (uns 150 mM). El laberint membranós està ple d'**endolimfa**, amb un alt contingut de K<sup>+</sup> (uns 150 mM) i baix contingut de Na<sup>+</sup> (uns 16 mM), la qual banya els receptors sensorials especialitzats del sistema vestibular.



**Figura I24.** Laberint membranós i les seves parts. L'aparell vestibular està format per tres conductes semicirculars, l'utricle i el sàcul. Font: imatge adaptada de Netter, Atlas de neurociència. Felter and Shetty.

Els receptors vestibulars es troben en regions especialitzades del laberint membranós (Fig. I24). Aquest laberint vestibular conté dues estructures amb funcions diferents: els **conductes semicirculars** i els **òrgans otolítics** (utricle i sàcul). En total, hi ha cinc **epitelis sensorials** vestibulars a cada orella: tres **crestes**, un **utricle** i un **sàcul**. Els dos laberints vestibulars són estructures amb simetria especular, un dins cada orella i, a part, les funcions dels cinc òrgans receptors es complementen entre si ja que cada un d'ells té una orientació espacial diferent, permetent així captar els moviments en tots els plans tridimensionals de l'espai.

Sobre aquests epitelis sensorials trobem les **cèl·lules ciliades vestibulars**, els receptors sensorials del sistema vestibular.

Les cèl·lules receptores de cada òrgan vestibular estan innervades per **fibres aferents primàries** que s'uneixen a les de la còclea per formar el **nervi vestibulococlear** (Fig. I24). Els cossos cel·lulars de les neurones aferents vestibulars es troben al **gangli vestibular**. Les prolongacions centrals d'aquestes neurones entren al tronc de l'encèfal i acaben als nuclis vestibulars i al cerebel. Per altra banda, el sistema vestibular també rep **fibres eferents** des del tronc encefàlic.

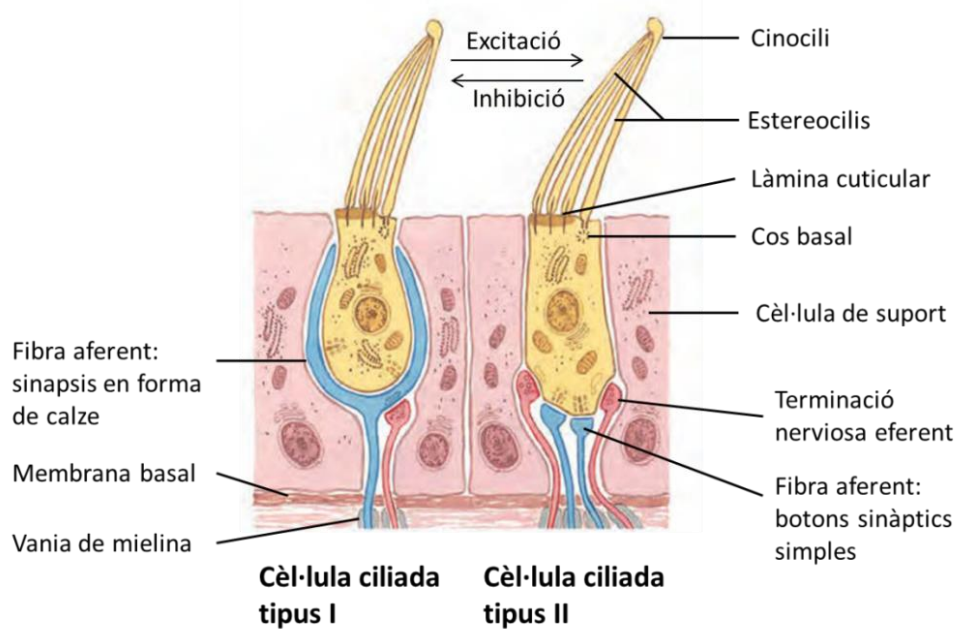
La irrigació del laberint, com en la còclea, arriba principalment de l'**artèria laberíntica**. L'arteria anterior vestibular subministra sang a la major part del sistema vestibular. Si s'interromp el subministrament de sang al laberint, la funció vestibular es veu compromesa.

### 2.3.2 Cèl·lules ciliades vestibulars i la seva innervació

Els receptors de l'equilibri són cèl·lules epitelials modificades; les **cèl·lules ciliades vestibulars**, les quals són les encarregades de transformar les acceleracions del cap en senyals elèctriques. Igual que a la còclea, les cèl·lules del laberint vestibular contenen feixos de cilis a la seva superfície apical que transdueixen els estímuls mecànics en potencials receptors, els **estereocilis** (uns 50-100) (Fig. I25). Però, en el vestíbul, un dels estereocilis resulta molt més llarg que els altres: el **cinetocili**. El cinetocili és un cili no mòbil amb una disposició de microtúbuls  $9 + 2$  (Oghalai and Brownell, 2012). Els estereocilis estan organitzats en files, del més alt, que és el més pròxim al cinocili, fins al més baix, i es distribueixen de manera hexagonal, on el cinocili ocupa un vèrtex d'aquesta estructura. Tots els cilis, menys el cinocili que es troba en contacte directe amb el citoplasma, sorgeixen d'una regió rígida d'actina densa, la **làmina cuticular**, que es troba en extrem apical de la cèl·lula. En aquest cas, també trobem **unions en punta** (tip links) que connecten tots els cilis a través de ponts de proteïnes que intervenen en el mecanisme de transducció (Oghalai and Brownell, 2012). En aquestes cèl·lules, els cilis es troben en contacte amb l'endolimfa però la posició basal es troba rodejada de perilimfa. Igualment, les cèl·lules ciliades del sistema vestibular perifèric estan **innervades per fibres aferents i eferents**.

### 2.3.2.1 Tipus de cèl·lules ciliades

L'epiteli vestibular consta de dos tipus morfològics diferents de cèl·lules ciliades; **cèl·lules ciliades tipus I** i **cèl·lules ciliades tipus II** (Fig. I25).

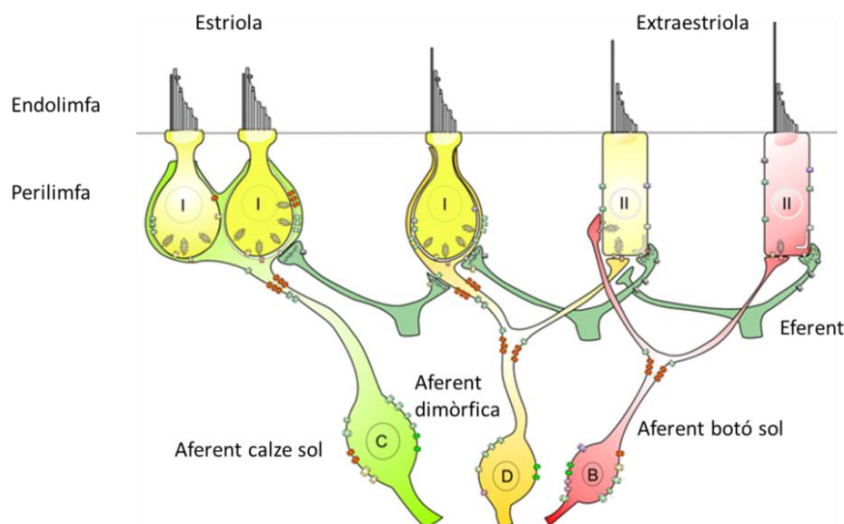


**Figura I25.** Estructura i innervació dels dos tipus de cèl·lules ciliades vestibulars. Font: imatge adaptada de Netter, Atlas de neurociència. Felter and Shetty.

Els dos tipus de cèl·lules ciliades són **morfològicament diferents** (Ricci et al., 1997). Les cèl·lules ciliades tipus I tenen un cos cel·lular que s'estreny a l'apex, en forma ampolla i tenen el seu nucli en la posició basal. Les cèl·lules ciliades tipus II són cilíndriques, amb el nucli en posició medial.

Aquestes cèl·lules es diferencien també per la seva **innervació**. Els axons perifèrics de les neurones perden el seu embolcall mielínic abans d'innervar les cèl·lules tipus I envoltant tota la zona basolateral, donant lloc a una sinapsi en forma de **calze**, aquest tipus de sinapsi és únic en el sistema nerviós (Bonsacquet et al., 2006; Dalet et al., 2012). En canvi, les cèl·lules tipus II estan innervades per **botons sinàptics simples**.

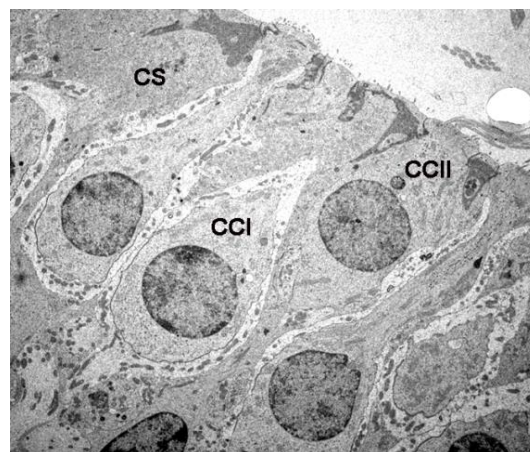
Cada **fibra aferent** pot innervar una o varies cèl·lules sensorials, tant de tipus I com de tipus II (Fig. I26). Per tant, podem trobar terminals aferents només de tipus **calze sol** (*calyx-only afferent*), **botó sol** (*bouton-only afferent*) o terminals d'ambdós tipus, conegudes com **dimòrfiques** (*dimorphic afferent*). Ambdues cèl·lules també tenen **connexions eferents** que arriben del nucli vestibular per modular la seva sensibilitat.



**Figura I26.** Esquema de l'epiteli vestibular, mostrant les diferents innervacions de les terminals nervioses de les neurones aferents, com les aferents calze sol (C), dimòrfiques (D) o botó sol (B) i el lloc i la distribució preferents dels dos tipus de cèl·lules ciliades vestibulars al llarg de l'epiteli. Font: imatge adaptada de Eatock et al., 2008.

Els diferents tipus de cèl·lules ciliades es disposen de manera desigual al llarg de l'epiteli vestibular (Fig. I26). Les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents de calze sol es troben exclusivament a la zona estriolar, és a dir, més al centre de l'epiteli, mentre que les de tipus II són més abundants a la zona extraestriolar, per tant, a la zona perifèrica de l'epiteli. En la zona periestriolar són més abundants les cèl·lules ciliades de tipus I amb aferents dimòrfics.

Les cèl·lules ciliades es troben rodejades per **cèl·lules de suport** que s'estenen des de la membrana basal a la superfície apical (Fig. I27). Existeix una membrana reticular a la zona apical que connecta les cèl·lules adjacents per tal de mantenir una barrera entre l'espai endolimfàtic de l'espai perilimfàtic. Aquestes cèl·lules presenten nombroses microvellositats a la seva superfície.



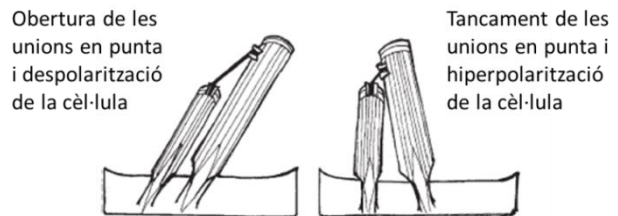
**Figura I27.** Imatge de microscòpia electrònica de transmissió d'una cresta de rata on s'observen les cèl·lules de suport (CS) i els dos tipus de cèl·lules ciliades: cèl·lules ciliades de tipus I (CCI) i cèl·lules ciliades de tipus II (CCII). Font: imatge adaptada de Seoane et al., 2001.



### 2.3.2.2 Mecanisme de transducció

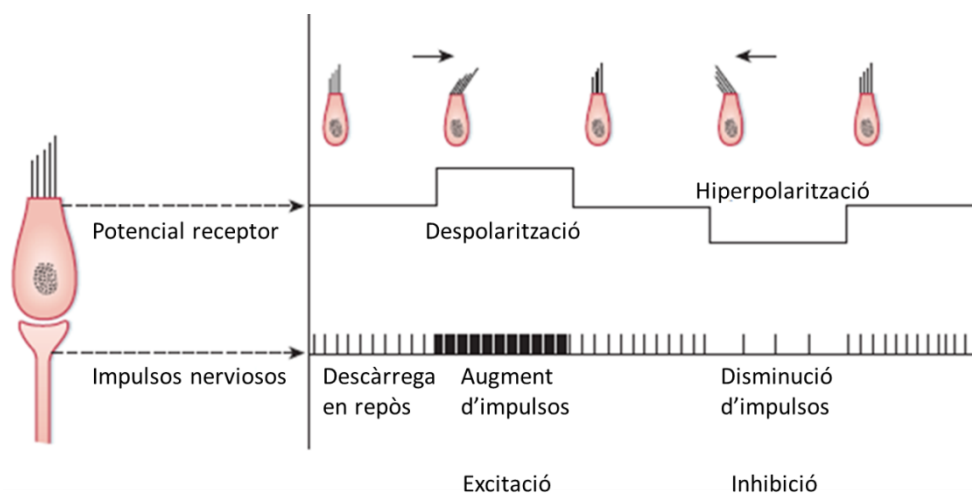
Les cèl·lules ciliades vestibulars, igual que les de la còclea, estan polaritzades. Aquesta disposició permet a les cèl·lules respondre de manera diferent a les inclinacions dels cilis en funció de la direcció de l'estímul. La diferent composició d'ambdós líquids fa que la cèl·lula trobi en el exterior de la seva part apical una alta concentració de K<sup>+</sup> i baixa de Na<sup>+</sup>, el contrari del que passa a la membrana basal.

Com passa en les cèl·lules ciliades cocleares, quan els estereocilis es dobleguen cap al cinocili, el desplaçament de les unions en punta fa que els canals catiónics s'obrin i es despolaritza la membrana



**Figura I28.** Funcionament de les unions en punta de les cèl·lules ciliades. Font: imatge adaptada de Khan and Chang, 2013.

cel·lular (Fig. I28). Aquesta despolarització promou l'alliberació de neurotransmissors excitadors (glutamat) entre aquestes cèl·lules, que són presinàptiques, i les fibres nervioses aferents de les neurones ganglionars vestibulars (Fig. I29). A la inversa, quan els cilis s'inclinen allunyant-se del cinocili, la tensió de la unió disminueix i es tanquen de manera mecànica els canals, la qual cosa causa la hiperpolarització de la cèl·lules ciliades i disminueix l'alliberament de neurotransmissors. D'aquesta manera, la freqüència de potencials d'acció en les neurones sensorials que innerven les cèl·lules ciliades dona informació sobre la direcció dels moviments del cap. Les cèl·lules ciliades també presenten un mecanisme d'adaptació que actua ajustant de manera contínua la tensió dels ponts proteics.



**Figura I29.** Mecanisme de transducció de les cèl·lules ciliades vestibulars. Quan els estereocilis estan doblegats cap el cinetocili, la cèl·lula està despolaritzada i la fibra aferent està excitada. Quan es dobleguen cap el costat oposat, la cèl·lula ciliada està hiperpolaritzada i la descàrrega aferent disminueix. Font: imatge adaptada de Berne y Levy. Fisiologia. Levy, Koeppen and Stanton.

### 2.3.2.3 Innervació de les cèl·lules ciliades vestibulars

Els òrgans vestibulars es troben innervats per **fibres eferents** que provenen del tronc encefàlic (Gacek, 1982; Schwartz and Ryan, 1986). Les terminacions eferents formen contactes sinàptics amb els dos tipus de cèl·lules ciliades (Fig. I26) (Iurato et al., 1972; Smith and Sjostrand, 1961). El sistema eferent permet el control de la informació vestibular i, per consegüent, el manteniment de l'equilibri postural. Aquestes fibres poden ampliar el marge dinàmic de les fibres aferents durant grans acceleracions (Blanks and Precht, 1978) i també poden funcionar com senyals inhibidòries quan hi ha un estímul sensorial de forta intensitat i/o llarga durada (Goldberg and Fernández, 1980).

Pel que fa al **sistema aferent**, els cossos cel·lulars de les neurones vestibulars primàries que estableixen contacte amb les cèl·lules ciliades es troben al **gangli vestibular**, situat prop dels epitelis sensorials. A la membrana de la cèl·lula que estableix sinapsi en calze hi ha una unió intercel·lular rara en vertebrats, anomenada “**unió calicial**”, que proporciona suport estructural al contacte sinàptic aferent del calze amb les cèl·lules ciliades vestibulars tipus I. El nucli d'aquesta unió és un dímer de **Caspr1** i **Contactina**. La zona de la unió calicial representa un microdomini funcional caracteritzat per la col·localització de nombroses proteïnes d'adhesió cel·lular, de matriu extracel·lular i de canals iònics (Lysakowski et al., 2011).

### 2.3.3 Epitelis vestibulars

Com s'ha dit anteriorment, trobem cinc **epitelis sensorials vestibulars** a cada orella: tres **crestes**, un **utricle** i un **sàcul**, formats per una capa de cèl·lules ciliades envoltades per cèl·lules de suport.

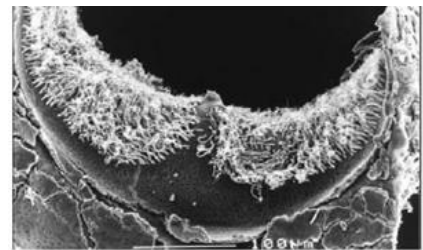
Els tres conductes semicirculars es connecten a l'utricle, aquest s'uneix al sàcul i, finalment, el sàcul es connecta a la còclea a través del *ductus reuniens*, la qual cosa permet la circulació de l'endolimfa entre ambdós òrgans (Fig. I24).



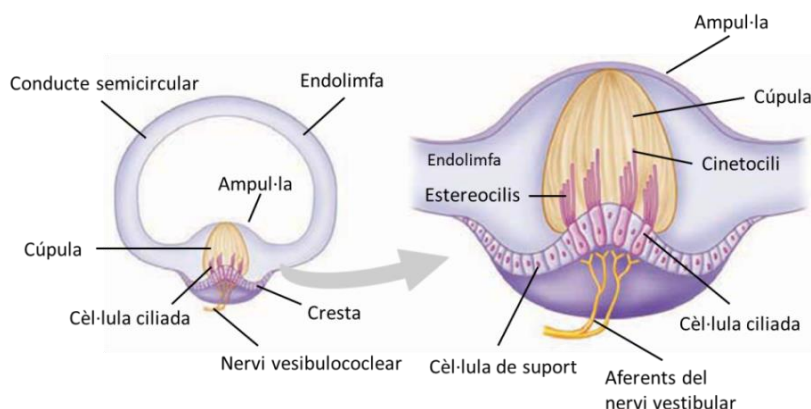
### 2.3.3.1 Conductes semicirculars

Els **conductes semicirculars** estan orientats en plans perpendiculars entre si, la qual cosa permet detectar els moviments rotatoris del cap en els tres plans (Fig. I24). Els dos conductes que es troben en posició vertical, formant un angle d'uns 45° respecte el pla sagital del cap, són els **conductes semicirculars anterior i posterior**, i el tercer és el **conduïte semicircular lateral** que es troba inclinat uns 30° respecte al pla de la mirada. El conduïte anterior detecta la rotació del cap cap amunt i cap avall, com quan assentem o es fa un salt mortal. El posterior detecta la rotació del cap cap amunt i cap a baix de costat, com quan movem l'orella cap a l'espatlla o es fa una tombarella lateral. El conduïte lateral detecta la rotació del cap cap a un costat i cap a l'altre, com quan girem el cap per dir "no" o es gira al voltant de l'eix.

La posició dilatada dels conductes és l'**ampul·la**, on hi trobem una protuberància anomenada **cresta** que actua com el neuroepiteli sensorial ja que conté les cèl·lules ciliades, unes 7.000 a l'humà (Fig. I30). Aquestes cèl·lules es troben cobertes per una massa gelatinosa de mucopolisacàrids i queratina, la **cúpula**, que té una densitat més alta que la de l'endolimfa i uneix la cresta amb el sostre de l'ampul·la (Fig. I31).



**Figura I30.** Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de la cresta d'una rata. Font: Llorens et al., 1993a.

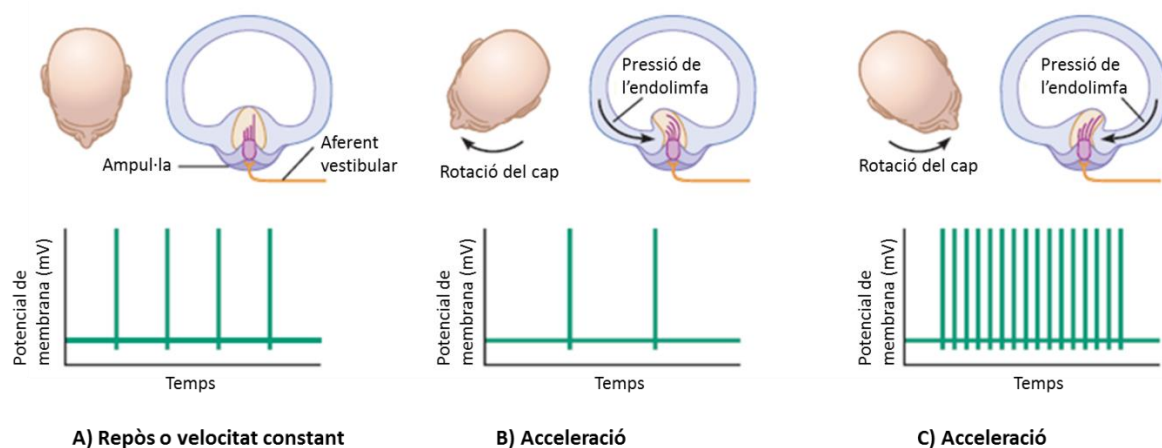


**Figura I31.** Anatomia funcional dels conductes semicirculars. Font: imatge adaptada de Principios de Fisiología humana. Stanfield.

Els cilis de les cèl·lules ciliades s'estenen verticalment dins la cúpula. A les tres crestes, les cèl·lules estan orientades de manera que tots els cilis senyalin a la mateixa direcció. Per tant, quan la cúpula es mou, totes les cèl·lules ciliades de la cresta s'inclinen cap al mateix costat. Els cinocilis del conduïte lateral estan orientats cap a l'utricle, mentre que els dels conductes anterior i posterior estan orientats en sentit oposat, cap al conduïte (Khan and Chang, 2013).

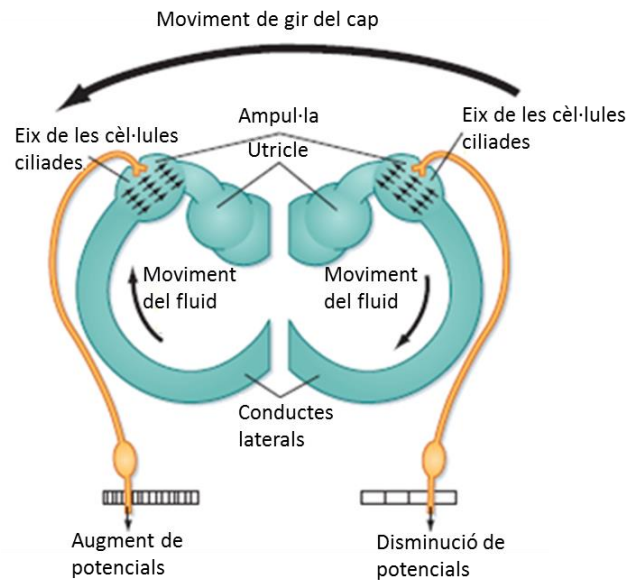
La **funció dels conductes semicirculars** és detectar l'acceleració o desacceleració rotacional del cap. Els conductes estan plens d'endolimfa, la qual, a causa d'una acceleració angular del cap, fa que la cúpula es desviï i, conseqüentment, els cilis s'inclinen.

Quan el cap es troba en repòs, sense cap força que actua sobre la cúpula, els estereocilis estan rectes i les cèl·lules ciliades es troben parcialment despolaritzades, generant uns potencials d'acció de baixa freqüència a les neurones aferents associades (Fig. I32A). Quan el cap gira, les parets del laberint es mouen, però el líquid de dins el laberint roman al seu lloc a causa de la inèrcia. La resistència de l'endolimfa inclina la cúpula i les seves cèl·lules ciliades en direcció oposada a la direcció en la qual està girant el cap. Si la direcció de la rotació fa que els estereocilis s'inclinin allunyant-se del cinetocili, la cèl·lules ciliades s'hiperpolaritzen i la freqüència dels potencials d'acció a la neurona aferent es redueix (Fig. I32B). En canvi, si els estereocilis s'inclinen cap el cinetocili, les cèl·lules es despolaritzen i la freqüència dels potencials d'acció augmenta (Fig. I32C). Finalment, si la rotació continua amb una velocitat constant, sense acceleració, la cúpula torna a la posició vertical i el potencial de membrana es normalitza, com quan trobem el cap en repòs (Fig. I32A). Quan s'atura la rotació de manera sobtada, la inèrcia de l'endolimfa fa que la cúpula es corbi en la direcció oposada, és a dir, es desplaça en la mateixa direcció que el moviment del cap, la qual cosa genera una sensació temporal de contrarotació.



**Figura I32.** Resposta del conducte semicircular lateral a les rotacions del cap en el pla horitzontal. (A) Cap en repòs o rotació amb una velocitat constant, cap força neta actua sobre la cúpula i els estereocilis es troben rectes. (B) Acceleració del cap, la inèrcia del líquid empeny la cúpula en la direcció oposada a la de la rotació i els estereocilis s'inclinen hiperpolaritzant la cèl·lula ciliada. (C) Acceleració del cap en direcció oposada, els estereocilis s'inclinen polaritzant la cèl·lula ciliada. Font: imatge adaptada de *Principios de Fisiología humana*. Stanfield.

Cada conducte semicircular funciona associat amb el que es troba al costat oposat del cap i té les seves cèl·lules ciliades alineades en direcció contrària. Per tant, els canals semicirculars funcionen per parells situats en un mateix pla. La rotació del cap inclina la cúpula en direccions oposades a cada un del parell de conductes creant missatges oposats, fent que les cèl·lules ciliades d'un conducte s'exciten mentre que les del costat oposat s'inhibeixen. Per exemple, quan el cap gira cap a l'esquerre, la cúpula fa que els estereocilis de les cèl·lules ciliades s'inclinin cap al cinocili en el conducte lateral esquerre, produint una excitació de les cèl·lules ciliades (Fig. I33). Contràriament, en el conducte lateral dret, els cilis es dobleguen lluny del cinocili, disminuint la freqüència dels potencials. Si el moviment del cap és cap a la dreta, el resultat és l'oposat. Les neurones dels nuclis vestibulars reben informació dels receptors d'ambdós costats i interpreten la rotació en funció de les freqüències de descarrega relatives a les fibres aferents d'ambdós conductes.

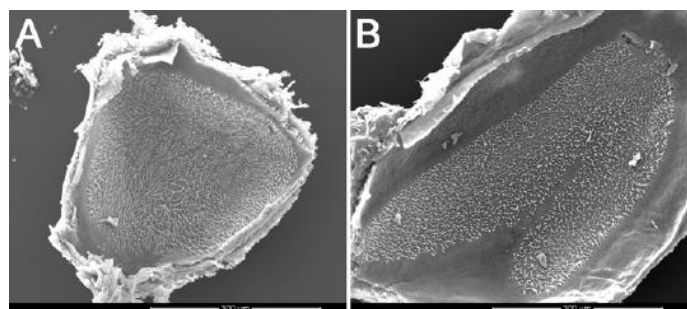


**Figura I33.** Efecte del moviment del cap cap a l'esquerre en l'activitat de les fibres aferents vestibulars que innerven les cèl·lules ciliades en els canals semicirculars laterals. Font: imatge adaptada de Berne y Levy. Fisiología. Levy, Koeppen and Stanton.

La informació derivada dels conductes semicirculars s'utilitza per controlar **moviments oculars**, la qual cosa es desenvolupa més endavant.

### 2.3.3.2 Òrgans otolítics

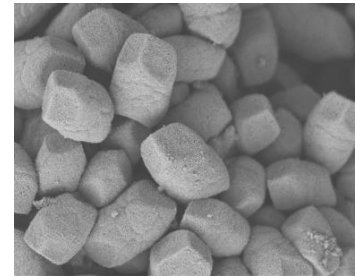
Trobem dos tipus d'òrgans otolítics; l'**utricle** (Fig. I34A) i el **sàcul** (Fig. I34B), que es troben situats entre els conductes semicirculars i la còclea.



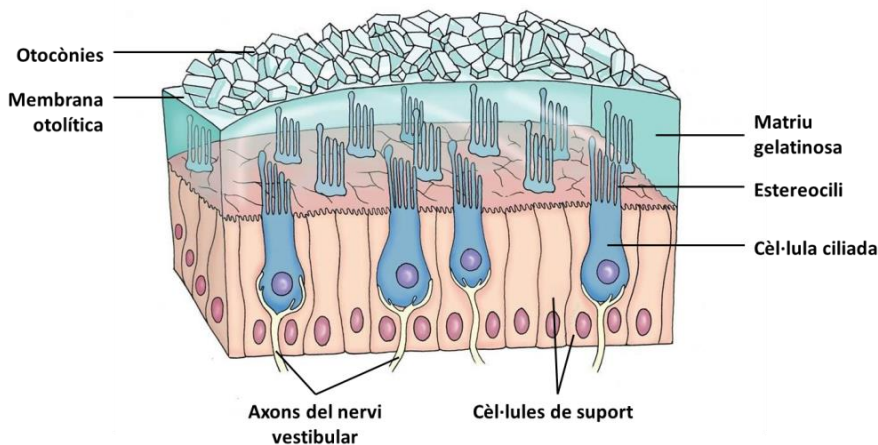
**Figura I34.** Imatge de microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans otolítics de la rata. (A) Utricle. (B) Sàcul. Font: Tesis Lara Sedó Cabezón, 2014.

Cada òrgan otolític conté un epiteli sensorial anomenat **màcula**, que està orientat verticalment al sàcul i horitzontalment a l'utricle. La màcula conté les cèl·lules de suport que envolten les cèl·lules ciliades, amb els cilis envoltats d'una coberta gelatinosa de mucopolisacàrids. L'utricle humà conté unes 30000 cèl·lules ciliades, mentre que el sàcul en té entorn de 16000.

La massa gelatinosa de mucopolisacàrids conté diminuts cristalls inorgànics de carbonat càlcic anomenats **otocònies** d'1-5 µm de diàmetre (el terme prové del grec i significa “pedres de l'oïda”) (Fig. I35). En conjunt, la massa gelatinosa i les seves otocònies es coneix com **membrana otolítica** (Fig. I36). Les otocònies augmenten la densitat de la membrana, proporcionant-li inèrcia quan hi ha una acceleració.

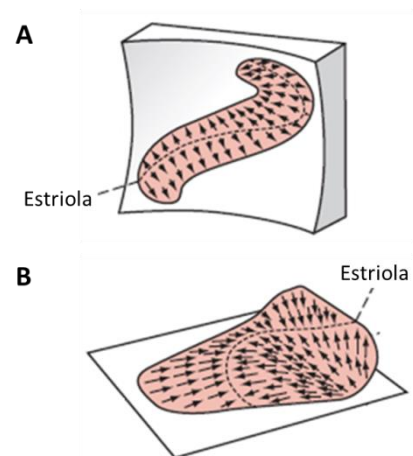


**Figura I35.** Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de les otocònies de l'utricle d'una rata.



**Figura I36.** Màcula. Epiteli sensorial amb cèl·lules ciliades i cèl·lules de suport, recobert per una massa gelatinosa amb les otocònies. Font: imatge adaptada de Neuroscience: Exploring the brain. Bear, Connors and Paraiso.

Als òrgans otolítics, les cèl·lules ciliades es disposen de manera ordenada. No es troben totes orientades en la mateixa direcció, la disposició de les cèl·lules canvia al centre de les màcules, a banda i banda d'una línia imaginària anomenada **estriola** (Fig. I37). En l'utricle, els estereocilis estan orientats cap a l'estriola, mentre que en el sàcul es troben en sentit oposat. A causa de la trajectòria corba de l'estriola, trobem cèl·lules orientades en totes les direccions. Aquesta distribució indica que hi ha diversos patrons d'excitació de les cèl·lules depenent del grau d'inclinació del cap (Khan and Chang, 2013).



**Figura I37.** Polarització funcional de les cèl·lules ciliades en els òrgans otolítics. (A) Sàcul. (B) Utricle. Font: imatge adaptada de Berne y Levy. Fisiología. Levy, Koeppen and Stanton.

Així doncs, el moviment pot estimular un grup de cèl·lules ciliades mentre que inhibeix unes altres i, fins i tot, no causa cap afecte sobre un altre grup de cèl·lules (Tascioglu, 2005). El SNC analitza la freqüència dels potencials de cada una de les cèl·lules per determinar la posició del cap i la direcció del moviment.

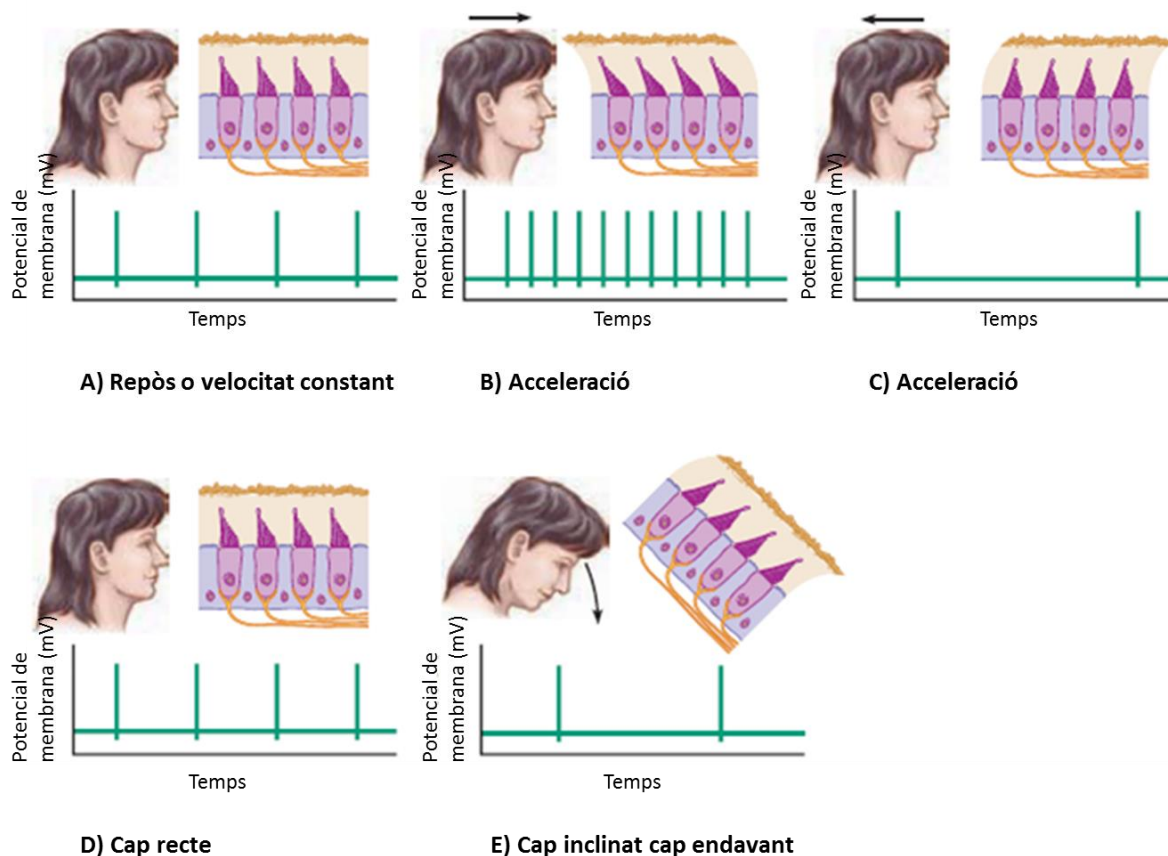
La **funció dels òrgans otolítics** és respondre a l'acceleració lineal del cap i les forces gravitacionals. L'estructura d'aquests òrgans els permet percebre tant els desplaçaments estàtics causats per la inclinació del cap en relació amb l'eix gravitacional, com els transitoris causats per moviments de translació del cap. A causa de l'orientació dels cilis en la membrana otolítica, l'utricle detecta l'acceleració cap endavant i cap endarrere, mentre que el sàcul la detecta cap amunt i cap avall (força gravitacional).

Quan es mou el cap, les otocònies es desplacen respecte l'endolimfa circumdant. Aquest desplaçament desvia la coberta gelatinosa que cobreix la màcula i inclina els cilis de les cèl·lules ciliades. Ara bé, una important propietat fisiològica de la màcula és la seva adaptació, és a dir, quan el cap rep un mateix estímul durant varis segons, les cèl·lules retornen a la posició normal (Khan and Chang, 2013).

Per exemple, en l'**utricle**, quan una persona està en repòs o es mou cap endavant o enrere en una velocitat constant, les cèl·lules ciliades es troben en posició vertical, enviant potencials d'acció amb una freqüència moderada (Fig. I38A). Durant l'acceleració cap endavant, la membrana otolítica, a causa de la seva alta densitat, es mou més poc a poc que les cèl·lules, de manera que els cilis de l'utricle s'inclinen cap endarrere (Fig. I38B). Contràriament, quan hi ha una acceleració cap endarrere, els cilis es dobleguen cap endavant (Fig. I38C). Per altra banda, quan el cap es troba recte, els cilis estan en vertical (Fig. I38D), però quan el cap està inclinat cap endavant, la força de la gravetat desplaça les otocònies cap avall (Fig. I38E).

El **sàcul** funciona de la mateixa manera que l'utricle però, a causa de la seva orientació, és especialment sensible a les acceleracions verticals, de les quals, la gravetat és la més important.



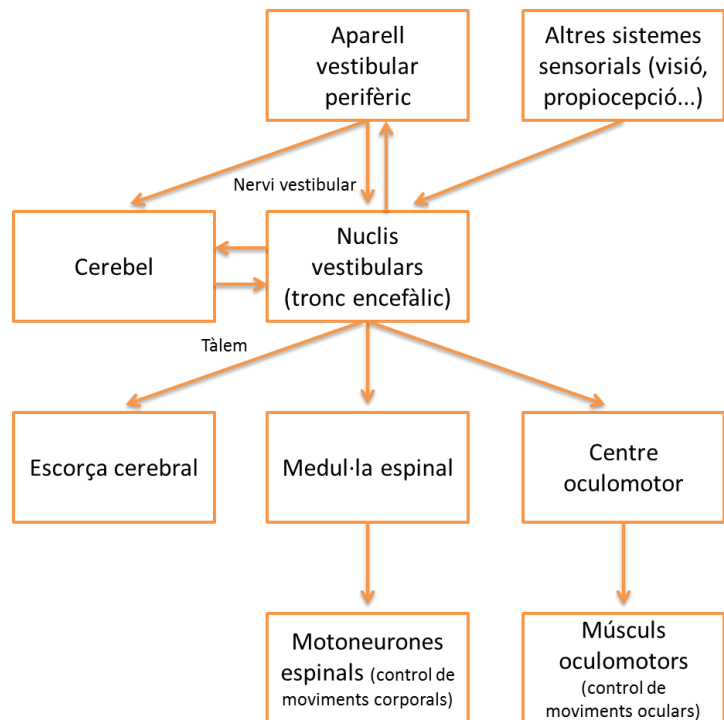


**Figura 138.** Resposta de l'utricle a les acceleracions lineals o a la inclinació del cap. (A) Cap en repòs o moviment constant, cap força neta actua sobre les otocònies i els estereocilis romanen rectes. (B) Acceleració cap endavant, els estereocilis s'inclinen en direcció oposada al moviment, augmentant la freqüència dels potencials de membrana. (C) Acceleració cap endarrere, els estereocilis s'inclinen en direcció oposada al moviment, disminuint la freqüència dels potencials de membrana. (D) Cap recte respecte la força de la gravetat. (E) Efecte de la gravetat sobre l'utricle. Font: imatge adaptada de *Principios de Fisiología humana*. Stanfield.

### 2.3.4 Vies vestibulars centrals

La informació captada per les diverses estructures perifèriques sensorials es transmet a través de les fibres aferents que entren al tronc encefàlic com a part del **nervi vestibulococlear**, dirigint-se cap als quatre **nuclis vestibulars** (superior, inferior, medial i lateral) o, a vegades, arriben directament al **cerebel** (Fig. I39). Els nuclis vestibulars són els processadors primaris de la informació vestibular i formen connexions directes i ràpides entre les neurones amb informació aferent i les neurones motores eferents. El cerebel és el processador adaptable, supervisa el funcionament vestibular i reajusta el procés vestibular central quan és necessari.

Els nuclis vestibulars, a part de rebre la informació del sistema perifèric vestibular, també li arriben les aferències d'altres sistemes ja que l'equilibri es manté gràcies a la informació recollida pels receptors vestibulars, els receptors propioceptius i els receptors visuals. Des d'aquests nuclis, la informació sobre la posició i el moviment del cap es distribueix a diferents zones de l'**escorça cerebral** via tàlem. Igualment, neurones dels nuclis vestibulars es dirigeixen cap als **nuclis dels músculs extra-oculars**, que controlen el moviment dels ulls, cap a les **motoneurones espinals**, que controlen els reflexes posturals, i també cap al **cerebel**.



**Figura 139.** Vies neuronals associades al sistema vestibular i involucrades en el manteniment de l'equilibri.

#### 2.3.4.1 Gangli i nervi vestibular

El **gangli vestibular**, també conegut com a **gangli de Scarpa**, es troba en la posició lateral del meatus auditori intern i és on es troben els cossos cel·lulars de les fibres vestibulars. Trobem unes 20.000 cèl·lules ganglionars bipolars amb l'axó perifèric (part distal) innervant les cèl·lules ciliades dels conductes semicirculars o els òrgans otolítics i l'axó central en contacte amb el SNC (Tascioglu, 2005). El gangli vestibular es divideix en dues parts unides per un istme; la part superior, on es troben els cossos cel·lulars de les aferències que provenen dels conductes semicirculars lateral i anterior i la màcula de l'utricle, i la part inferior, que conté els cossos cel·lulars del conducte posterior i la màcula del sàcul.

Els axons del gangli vestibular s'uneixen per formar el **nervi vestibular**, el qual es combina amb el nervi coclear per formar el **nervi vestibulococlear**. Aquest nervi arriba als diferents nuclis vestibulars o directament al cerebel (Fig. 139).

### 2.3.4.2 Nuclis vestibulars

Els nuclis vestibulars són centres importants d'integració de les diferents informacions que arriben del sistema sensorial, el sistema motor i el sistema cognitiu, i és el processador primari vestibular. Aquest complex ocupa una gran part del bulb raquidi i proporciona informació pel control del moviment dels ulls, cap i cos. Trobem quatre nuclis vestibulars majors; superior, lateral, medial i inferior, i alguns nuclis menors, entre els quals destaquen el nucli intersticial del nervi vestibular i els nuclis X, Y i Z.

El **nucli vestibular superior** o de Bechtew rep aferències de les crestes dels conductes semicirculars posterior i anterior, i envia fibres eferents a través del fascicle medial longitudinal cap als músculs extra-oculars, intervenint principalment en la generació del reflex vestibulo-ocular en el pla vertical. El **nucli vestibular lateral** o de Deiters rep fibres aferents de les crestes, les màcules, i del cerebel o de la medul·la espinal i les seves projeccions eferents es dirigeixen cap al tracte vestibulo-espinal lateral, participant en el control de la postura. El **nucli vestibular medial** o de Schwalbe és el major del complex vestibular i rep aferències de la cresta del canal semicircular lateral i participa en el control dels moviments oculars i en els reflexos posturals compensatoris. Finalment, el **nucli vestibular inferior** o de Roller rep informació aferent de la màcula de l'utricle i dels conductes semicirculars i envia projeccions cap als altres tres nuclis i cap al cerebel.

Ambdós complexos vestibulars que es troben a cada costat del tronc cerebral, es connecten a través d'un sistema de fibres comissurals, les quals actuen com a aferents inhibidores. Per tant, aquest sistema permet disminuir, a nivell central, la senyal present en les neurones vestibulars d'un costat durant l'activació de les seves homòlogues del costat contrari.

Com s'ha dit, els nuclis vestibulars envien fibres eferents cap el centre oculomotor del tall encefàlic i cap a la medul·la espinal. A més, es projecten cap al cerebel per modular i coordinar l'activitat muscular i postural i, fins i tot, alguns axons arriben fins a l'escorça cerebral a través del tàlem. Aquests nuclis també envien fibres eferents cap a les cèl·lules ciliades dels receptors vestibulars perifèrics (Fig. I39).



### 2.3.4.3 Cerebel

El cerebel funciona com un processador adaptatiu pel sistema vestibular i té un paper important en la coordinació motora encara que no genera activitat muscular. Supervisa el funcionament del vestíbul i reajusta l'entrada inhibint el flux d'informació, quan és necessari, a través de fibres que es dirigeixen als nuclis vestibulars (Fig. I39). També juga un important paper en l'aprenentatge motor, l'adaptació i la compensació pels dèficits vestibulars.

El **vestibulocerebel** és la part del cerebel implicada amb el sistema vestibular i està dividit en tres parts; el cerebel flocular, el cerebel nodular i el cerebel vermis, els quals estan implicats en els diferents reflexos vestibulars (Khan and Chang, 2013).

### 2.3.4.4 Tàlem i escorça vestibular

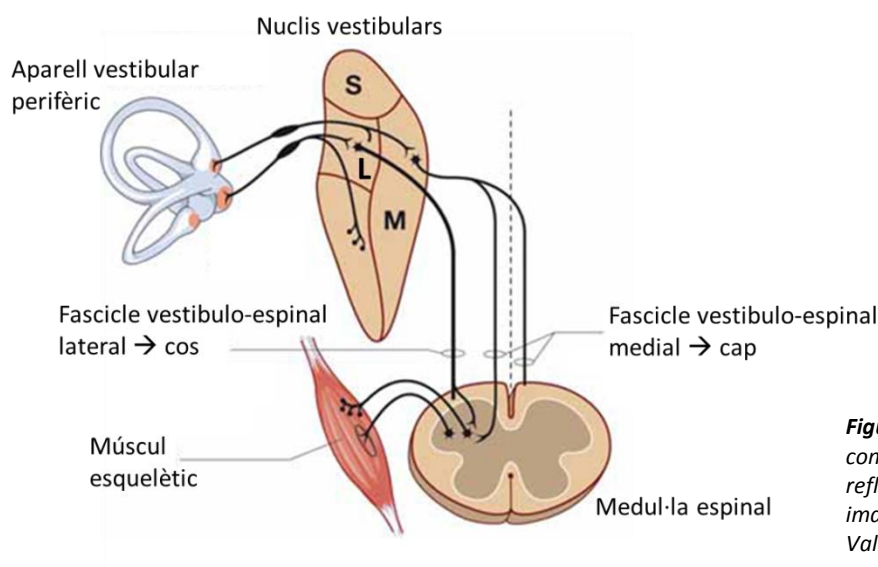
Alguns nuclis vestibulars també envien axons al **complex nuclear ventral posterior** del **tàlem**, que a la vegada es projecta cap a **dues àrees de l'escorça cerebral** rellevants pel sistema vestibular; una es troba a la zona posterior de l'escorça somatosensitiva, i l'altra a la transició entre l'escorça somatosensitiva i la motora (àrea tercera de Brodmann). Les neurones d'aquestes àrees responen als estímuls propioceptius, visuals i vestibulars. La integració de la informació d'aquests tres sistemes proporciona informació de la orientació espacial del cos.

### 2.3.5 Reflexos vestibulars

Els propioceptors musculars, els receptors articulars i el sistema vestibular es complementen i s'envien la informació necessària per tal de produir els reflexos compensatoris més adequats. Les projeccions centrals del sistema vestibular participen en tres reflexos: **reflex vestibulo-ocular (RVO)**, implicat en el control dels moviments dels ulls, **reflex vestibulo-espinal (RVE)**, coordina el moviment de la musculatura del cap i **reflex vestibulo-còlic (RVC)**, responsable de l'orientació espacial.

### 2.3.5.1 Reflex vestibulo-espinal

El sistema vestibular influeix en el to muscular, ajustant la postura del cos i el cap (Fig. I40). Per controlar els músculs del cos, el RVE és mediat pel tracte **vestibulo-espinal lateral**, el qual estableix connexions amb les motoneurons  $\alpha$  i  $\gamma$  dels músculs extensors. Per controlar els músculs del cap, les fibres surten del nucli vestibular medial formant el tracte **vestibulo-espinal medial** fins a arribar a la medul·la espinal, des d'allí es dirigeixen cap motoneurons del coll.



**Figura I40.** Circuits amb les connexions que intervenen en el reflex vestibulo-espinal. Font: imatge adaptada de dr. Cock, Valérie.

### 2.3.5.2 Reflex vestibulo-ocular

Aquest reflex és el responsable de l'aparició dels moviments oculars compensatoris que es produeixen com a conseqüència de l'estimulació dels òrgans vestibulars, tant les crestes semicirculars com les màcules. La funció del RVO consisteix en el manteniment de la posició dels ulls en l'espai i de manera independent de la posició del cap, permetent una visió estable durant els moviments. Per portar a terme això, el RVO provoca un moviment dels ulls que és d'igual magnitud, però en direcció oposada al moviment del cap. És un dels reflexos més ràpids del cos humà (uns 10 ms) i es dona igualment en l'obscuritat, encara que l'objectiu principal sigui mantenir estable una imatge visual.

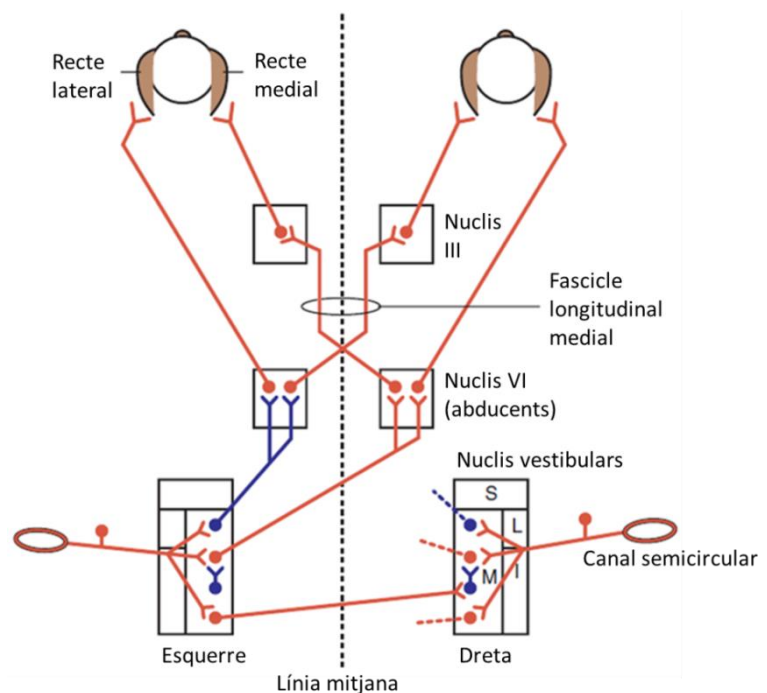
El RVO es dona en totes direccions i velocitats de moviment, tant si el moviment és rotatori com lineal o ambdós a la vegada (Crane et al., 1997; Paige 1991). Per tant, es poden originar dos RVOs diferents:

1. El **RVO de rotació** compensa la rotació del cap i rep, principalment, fibres aferents dels conductes semicirculars. Hi ha tres tipus de moviments oculars induïts per la rotació: els conductes semicirculars verticals i el sàcul són responsables de controlar els moviments verticals dels ulls, els conductes laterals i l'utricle els moviments horitzontals, i els conductes verticals i també l'utricle els moviments de torsió dels ulls.

2. El **RVO de translació** compensa el moviment lineal del cap i rep, principalment, fibres aferents dels òrgans otolítics.

Posem com exemple el **RVO horitzontal** (Fig. I41),. Les fibres aferents vestibulars implicades en el RVO formen sinapsis amb els nuclis vestibulars, principalment els medials i superiors, que envien informació al nucli abducents (nervi cranial VI) de manera bilateral; les neurones inhibidores (neurotransmissor: glicina o àcid gamma-aminobutíric: GABA) es projecten al mateix hemisferi, mentre que les excitadores (neurotransmissor: glutamat) es projecten al costat oposat.

Dos músculs de l'ull, un a cada costat, es troben implicats en aquest reflex; el múscul recte costat, es troben implicats en aquest reflex; el múscul recte medial, que es troba al costat interior, i el múscul recte lateral, que es troba al costat exterior. Ambdós músculs reben neurones inhibidores o excitadores (neurotransmissor: acetilcolina) per tal de que es contractin o es dilatin. El nucli VI innerva i controla directament el múscul recte lateral i, a la vegada, es projecta cap al nucli oculomotor (III) oposat, a través del fascicle longitudinal medial, el qual controla el múscul recte medial.



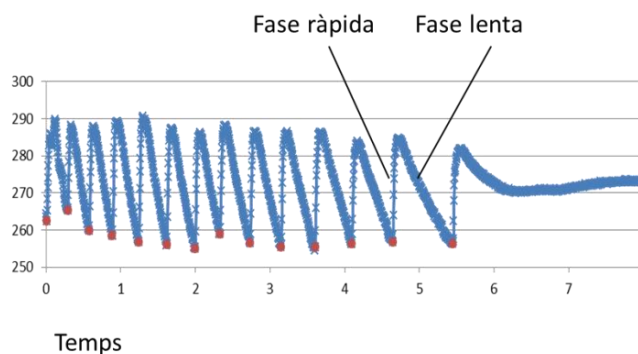
**Figura I41.** Circuits i connexions neuronals que intervien en el reflex vestibulo-ocular. Les neurones excitadores es mostren en vermell i les inhibidores en blau. Font: imatge adaptada de Berne y Levy. Fisiología. Levy, Koeppe and Stanton.

### 2.3.5.2.1 Nistagme

Quan hi ha un estímul del reflex optocinètic (ROC) o del RVO, inicialment els ulls es mouren en direcció contrària al moviment per tal de mantenir una imatge estable en la retina. Però, si l'estímul és prolongat, és a dir, grans rotacions del cap com passa quan girem el cos 360°, els ulls arriben al seu límit mecànic, fent que la compensació no sigui possible, i la imatge es començaria a desplaçar sobre la retina. Per evitar aquesta situació, es produeix un moviment ràpid, dirigit pel tronc encefàlic, com una sacsejada dels ulls en sentit contrari, que fa que aquests tornin a la posició inicial per tal de començar la observació de l'escena visual de nou. Això és el que s'anomena com **fase ràpida**. Llavors, la rotació lenta, la **fase lenta**, induïda pel ROC i el RVO començarà de nou. Aquesta alternança de moviment ràpid i lent en sentits oposats és el **nistagme** (Fig. I42). Per tant, podem definir el nistagme com un moviment involuntari i ràpid dels globus oculars, caracteritzat per una successió rítmica i repetitiva de moviments dels ulls, canviant alternativament de direcció (Goddé-Jolly and Larmande, 1973).

Trobem diferents tipus de nistagme depenent del seu origen. El **nistagme vestibular** és la resposta reflex després d'una estimulació de l'aparell vestibular (Beaudoin and Weiss-Lambrou, 1984).

Quan una rotació s'atura sobtadament, la inèrcia del líquid endolimfàtic estimula les cèl·lules ciliades en sentit contrari de la rotació del cap, i es produirà un nistagme en direcció contrària a la de la rotació imposada: **nistagme post-rotatori**.



**Figura I42.** Moviments oculars enregistrats que es produeixen durant el nistagme post-rotatori amb les dues fases característiques.

A més d'aparèixer en condicions normals per estímuls del RVO i del ROC, el nistagme pot aparèixer com a resultat de lesions en els circuits vestibulars, tant en l'orella interna (nistagme perifèric) com en els centres nerviosos (nistagme central), i pot utilitzar-se com una eina clínica per avaluar la funció del sistema vestibular. És la senyal més objectiva per identificar un trastorn transitori o persistent de l'aparell vestibular, des de lesions perifèriques fins a lesions centrals (Gabersek et al., 1963). Després d'una lesió vestibular, el RVO pot disminuir, però, a causa de la gran plasticitat neural, pot retornar a les condicions basals després de pocs dies o setmanes (Courjon et al., 1977; Paige 1983a, 1983b).

### 2.3.6 Disfunció vestibular

Com hem vist, el sistema vestibular és responsable de mantenir la postura i de controlar els moviments oculars. L'alteració de la funció d'aquest sistema provoca vertigen, pèrdua d'equilibri i pèrdua de mirada fixa durant el moviment, sovint acompanyada de marejos i nàusees, la qual cosa comporta l'increment en el risc de caigudes. Nombroses patologies poden afectar les vies del sistema vestibular. Les patologies perifèriques són aquelles que afecten els òrgans de l'orella interna i/o el nervi cranial VIII, mentre que les patologies centrals afecten les vies del SNC que formen part d'aquest sistema.

Les persones amb una lesió unilateral del sistema vestibular tenen la sensació de donar voltes, i presenten moviments oculars anormals i vertigen. En canvi, si el sistema vestibular es lesiona bilateralment, els individus afectats no són conscients del dèficit sensorial.

El **mareig** és un terme inespecífic que, generalment, es refereix a una desorientació espacial. Pot acompanyar-se de nàusees o d'instabilitat postural. El **vertigen** és una percepció de moviment del cos, habitualment rotatòria, que s'experimenta sense que hi hagi moviment real. L'origen del vertigen pot ser central, degut a patologies del sistema nerviós, o bé perifèric, degut a patologies dels òrgans vestibulars (modificació de l'homeòstasi iònica de l'endolimfa, mecano-transducció ineficaç, mort de cèl·lules ciliades o neurones vestibulars, dany en en contacte sinàptic...), moltes de les quals són causades per substàncies ototòxiques. La lesió vestibular també es pot caracteritzar per un **nistagme** persistent, que és evident inclús quan el cap es troba immòbil.

#### 2.3.6.1 Pèrdua de funció vestibular per l'edat

Com en totes les funcions sensorials, l'edat és una de les majors causes de la pèrdua de funció vestibular. Encara que no es conegui molt, es sap que sobre el 65 % i el 85 % de les persones majors de 60 i 80 anys, respectivament, tenen dificultats durant la marxa i això dona un augment del risc de patir una caiguda (Agrawal et al., 2009; Ishiyama, 2009).

### 2.3.6.2 Medicaments i solvents ototòxics

Una de les causes principals de la disfunció vestibular és la toxicitat d'alguns fàrmacs, com els aminoglicòsids (estreptomycina i gentamicina), els medicaments antipalúdics, diürètics de nansa, agents quimioterapèutics i una sèrie de productes químics d'exposició laboral (Hodgkinson and Prasher, 2006; Saldaña-Ruíz et al., 2012).

La disfunció vestibular apareix progressivament com a resultat d'un estrès lleu i persistent del sistema. Si l'estrès s'elimina, els símptomes poden persistir o disminuir, tenint una recuperació completa o parcial (Black et al., 2001, 2004). Els danys ototòxics són generalment bilaterals, simètrics i involucren tot el sistema vestibular, encara que la principal diana són les cèl·lules ciliades. No obstant això, s'ha comprovat en animals experimentals que molts d'aquests compostos mostren una evolució del dany seguint una seqüència específica: cresta > utricle > sàcul, i dins de cada epiteli la progressió del dany va des de part central a la part perifèrica (Aran et al., 1982; Balbuena and Llorens, 2003; Llorens et al., 1993a). Així i tot, no es coneix cap compost que provoqui una pèrdua completa en les crestes amb la funció otolítica intacta.

### 2.3.6.3 Possibles tractaments

Entre els agents farmacològics disponibles es poden trobar compostos focalitzats en els canals iònics i sobre els receptors de neurotransmissors implicats en els trastorns vestibulars. Però, tot i la importància de les cèl·lules ciliades, no trobem cap tractament que tingui com a diana aquestes cèl·lules a causa de la dificultat d'accedir a l'orella interna (Sekiya et al., 2007).

*“La vida no és estabilitat, és saber caminar en equilibri”*

## 2.4 Soroll

El **soroll** és un so generalment desagradable. Es defineix com a tot allò molest per l'oïda o, concretament, com tot so no desitjat que interfereix en la comunicació entre les persones o en les seves activitats.

Els éssers humans estem exposats cada dia al soroll (en el treball, en l'ambient, en l'oci...). Aquests sons són normalment moderats i no causen danys, però poden esdevenir perjudicials si s'exposen durant un llarg període de temps i/o amb una alta intensitat. El soroll pot tenir diferents efectes sobre la salut: danys fisiològics (pèrdua auditiva, efectes sobre l'equilibri...), psíquics (estrès, alteracions del somni, disminució de l'atenció, agressivitat...) i sociològics (alteracions en la comunicació, alteracions en el rendiment...).

Molts de sistemes i aparells corporals es veuen afectats pel soroll. Pot augmentar la pressió sanguínia, el ritme cardíac i el risc de patir una malaltia coronària, tant en animals (Hudak and Buckeley, 1961; Ising et al., 1999; Smookler and Buckley, 1969) com en humans (Cohen et al., 1981; Münzel et al., 2014), augmenta els nivells de diferents hormones i substàncies bioquímiques, tant en animals (Cransac et al., 1998; DeJoy, 1984; Henkin and Knigge, 1963) com en humans (Babisch, 2003; Brandenberger et al., 1980), disminueix la fertilitat i té un efecte sobre el sistema reproductor dels animals i humans (Meyer et al., 1989) i interromp les etapes del somni (Snyder-Halpern, 1985), entre altres.

### 2.4.1 Soroll i audició

L'exposició al soroll pot danyar l'orella interna i produir **pèrdues auditives neurosensorials**, la qual cosa pot impactar en la qualitat de vida. Aquesta pèrdua d'audició pel soroll és la segona causa més comú de pèrdua auditiva, després de la presbiacusia.

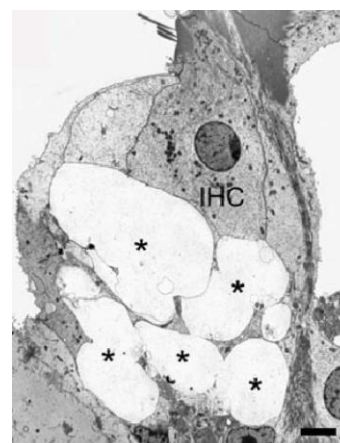
Al llarg de la història, i des de fa molts d'anys, s'han portat a terme molts estudis per avaluar els efectes del soroll sobre l'audició, tant en humans (Hirsh and Ward, 1952; Mills et al., 1981, 1979) com en animals de laboratori (Mills, 1973a, 1973b).



El dany i la pèrdua auditiva afecte les dues orelles i pot ser temporal o permanent. La naturalesa del soroll (continu, impulsiu o no continu), el temps d'exposició i la seva intensitat determinen la gravetat del dany sobre la còclea. L'exposició a un soroll impulsiu genera una lesió més severa que l'exposició a un soroll continu de la mateixa energia acústica (Dieroff, 1976; Venet et al., 2015).

Pel que fa a la intensitat, per un augment de 3 dB SPL (nivell de pressió sonora = *sound pressure level*), l'energia sonora es duplica. Per davall de **80 dB SPL**, l'orella humana no presenta alteracions definitives. Quan la intensitat supera els **90 dB SPL** comencen a aparèixer lesions irreversibles. Així i tot, la distància entre la font i l'individu exposat i el temps d'exposició al soroll són factors importants per a la protecció de l'audició. Com a resultat de moltes investigacions, tant en animals com en humans, les recomanacions d'exposició sonora són de màxim uns 85 dB SPL per un període de 8 h, sinó es poden trobar danys considerables sobre l'audició ("The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Noise and Hearing Loss," 1990). Els **valors límits d'exposició diària al soroll ( $L_{EX,8h}$ )** permesos a Europa i als Estats Units són 87 dB (A) i 90 dB (A), respectivament. La **ponderació A** és una ponderació de la freqüència que permet calcular el nivell global representatiu de la sensibilitat auditiva humana pels nivells febles.

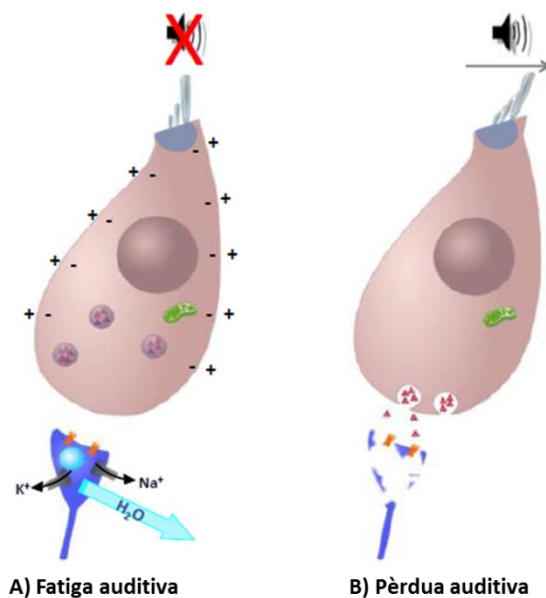
Els danys sobre el **receptor auditiu** són nombrosos. Un soroll continu pot provocar **fatiga auditiva**, que és un dèficit auditiu temporal, on els elements transductors no sofreixen problemes definitius. És, generalment, el resultat d'una fatiga metabòlica generada per exposicions sonores d'intensitat moderada però durant un període de temps relativament llarg (Fig. I43). Aquesta fatiga condueix a l'aparició de diferents fenòmens: vacuolització dels elements post-sinàptics davall les CCI (Liberman and Kujawa, 2017; Robertson, 1983; Ruel et al., 2007) o en les cèl·lules ganglionars (Wang et al., 2002), un escurçament de les arrels dels estereocilis que es troben a la placa cuticular i la generació de radicals lliures (Henderson et al., 2006). Recentment, s'ha demostrat que la pèrdua sinàptica entre les CCI i les neurones del gangli espiral es dona abans que la pèrdua cel·lular (Kobel et al., 2017; Liberman and Kujawa, 2017; Moser et al., 2013), la qual cosa és considerat com un dels responsables de les pèrdues auditives temporals. Com tota fatiga, el dèficit auditiu és temporal, mentre que hi hagi un període de repòs metabòlic.



**Figura I43.** Fenomen d'excitotoxicitat en una cèl·lula ciliada interna de la còclea (IHC) després d'una exposició al soroll. Font: Liberman and Kujawa, 2017.



Si l'exposició persisteix es transforma en una lesió irreversible de l'òrgan de Corti (Froymovich et al., 1995), i es parla, llavors, de **pèrdua auditiva** (Fig. I44). Així i tot, la pèrdua auditiva pot donar-se igualment com a conseqüència d'una exposició sonora breu però de forta intensitat. Els sorolls impulsius produeixen danys mecànics sobre els estereocilis per desordre o fusió (Mulroy and Whaley, 1984), pèrdua de unions en punta (Husbands et al., 1999; Zhao et al., 1996), o despolimerització (Liberman and Dodds, 1987), la qual cosa es pot veure immediatament després de l'exposició i pot ser reversible o no, depenent del grau de dany (Wang et al., 2002). Aquests sorolls també poden provocar lesions directament sobre l'epiteli neurosensorial de la còclea. Per altra banda, els sorolls continus generen nivells tòxics d'espècies reactives de l'oxigen (*reactive oxidative species* = ROS) i canvis fisiològics en la barrera sanguínia-laberíntica (Ohlemiller et al., 1999; Suzuki et al., 2002). També podem trobar una disrupció primerenca de les unions cel·lulars del epiteli sensorial (Zheng and Hu, 2012). Certs autors parlen de col·lapse de les cèl·lules de Hensen (Flock et al., 1999) o una possible desorganització de la membrana de Reissner (Mulroy et al., 1998; Wang et al., 2002). Tot això condueix a la **mort cel·lular de les cèl·lules ciliades** (Campo et al., 2014; Kurabi et al., 2017; Wang et al., 2002) i a la ruptura mecànica de les estructures de la còclea (Zenner et al., 1994). En els mamífers, una vegada es produeix la mort d'una cèl·lula ciliada no trobem regeneració.



**Figura I44.** Resposta al soroll d'una cèl·lula ciliada interna. (A) Després d'una llarga exposició, quan el soroll s'atura, s'allibera l'aigua acumulada entre la cèl·lula ciliada i la neurona, i la cèl·lula roman intacta = fatiga auditiva. (B) Si el soroll continua, la unió entre la cèl·lula ciliada i la neurona es trenca, provocant una pèrdua auditiva, que acabarà amb la mort de la cèl·lula = pèrdua auditiva. Font: INRS.

Igualment, a **nivell central**, s'observa una hiperactivitat del nucli dorsal coclear, del *colliculus inferior* i de l'escorça auditiva després d'una exposició sonora intensa i prolongada (Kaltenbach and Afman, 2000; Komiya and Eggermont, 2000; Ma and Young, 2006).

### 2.4.2 Soroll i vestíbul

L'efecte del soroll sobre el sistema vestibular ha estat menys estudiat i, per tant, trobem menys dades bibliogràfiques que pel sistema auditiu. Així i tot, fa molts d'anys ja es va parlar per primera vegada de la disfunció vestibular induïda per la pèrdua auditiva i es va relacionar l'aparició de vertigen amb el soroll d'una explosió (Habermann, 1890). Ja dins els anys 1900, Békésy va parlar dels moviments del cap en resposta a sons de gran intensitat, la qual cosa donava una evidència de l'efecte del so sobre l'òrgan vestibular (Pahor, 1979; von Békésy, 1935). Finalment, es va proporcionar una evidència histològica d'aquests danys sobre el neuroepiteli vestibular, i es va verificar que el tipus de soroll pot jugar un paper important en la disfunció vestibular (Ylikoski, 1987; Ylikoski et al., 1988). Així i tot, també trobem alguns estudis que contradiuen aquests resultats (Pyykkö et al., 1989).

La proximitat anatòmica del laberint vestibular i el sistema acústic, la semblança de l'estructura de les cèl·lules ciliades d'ambdós sistemes i l'artèria comú, donen suport a la possibilitat de trobar un dany vestibular associat a la pèrdua auditiva per exposició al soroll. Però la membrana que separa l'utricle i els canals semicirculars de la resta del vestíbul teòricament protegeix la majoria de les cèl·lules sensorials del sistema vestibular. Per tant, l'epiteli més exposat als sorolls és el sàcul (Cazals et al., 1983; Cassandro et al., 2003; McCabe and Lawrence, 1958). Els canals semicirculars són menys sensibles als sons impulsius que els òrgans otolítics, a causa de la propagació simètrica d'energia a través dels canals causant una diferència de pressió menor que en les màcules (Perez et al., 2002).

Dos mecanismes es troben involucrats en la destrucció dels òrgans vestibulars a causa del soroll: destrucció mecànica directe i descompensació mecànica amb la conseqüent degeneració dels elements sensorials (Manabe et al., 1995; Oosterveld et al., 1982; Ylikoski, 1987). A més, també s'ha trobat que algunes neurones del nucli vestibular i fibres aferents primàries són sensibles als sorolls intensos (Murofushi et al., 1999, 1995). Però, com en la còclea, la vulnerabilitat del vestíbul a l'exposició sonora depèn de diferents factors com el temps d'exposició, la intensitat i la duració i l'estat de les orelles (Perez et al., 2002).

Actualment, trobem grans evidències que indiquen que el sistema vestibular és estimulat principalment pel so ric en baixes freqüències (Cazals et al., 1982; Halmagyi et al., 2005).

### 2.4.3 Soroll de baixes freqüències

El soroll de baixa freqüència és un soroll que es troba dins un rang audible de sons greus. Aquest so travessa tot l'òrgan de Corti abans de ser discriminat a l'àpex de la còclea i és sovint generat per fonts naturals i artificials (soroll del transport, motors...), fent que hi hagi fàcilment una exposició diària. En humans, el soroll de baixa freqüència afecta diferents funcions fisiològiques, com el sistema cardiovascular (Danielsson and Landström, 1985), el nerviós (Landström, 1983), l'endocrí (Waye et al., 2002) i, lògicament, l'audició i el vestíbul.

Per la transducció de les baixes freqüències, portat a terme a l'àpex de la còclea, no existeix el procés d'amplificació realitzat per les CCE. Així i tot, la selectivitat de freqüències roman tant eficaç com a la base ja que les fibres nervioses són capaces de portar a terme aquesta funció de manera eficaç. Igualment, trobem diferències anatòmiques entre l'àpex i la base de la còclea: els estereocilis augmenten de talla i disminueixen en rigidesa a mesura que es dirigeixen cap a l'àpex (Wright, 1981a, 1981b) i la unió mecànica entre aquests i la membrana tectorial és menys eficaç a mesura que ens allunyem de la base (Lim and Freilich, 1981).

La **pèrdua auditiva** a causa dels sorolls de baixa freqüència és particular. Els dèficits d'audició induïts per aquest tipus de soroll poden estar ubicats en una finestra de freqüències més ampli que els induïts pels sorolls de mitjana i alta freqüència (Burdick, 1982; Burdick et al., 1978). Per tant, la funció auditiva, tant als humans com als animals, es troba més alterada pels sorolls de baixa freqüència que per les altres freqüències (Subramaniam et al., 1991). La naturalesa dels danys coclears induïts pel soroll de baixa freqüència no està ben descrit en la literatura, encara que alguns estudis parlen de la pèrdua d'unió entre la membrana tectorial i la membrana basilar a causa de la pèrdua de CCE (Zwislocki, 1984).

En els humans, l'exposició a aquests sorolls de baixes freqüències causen danys en la **funció vestibular** (Schust, 2004). En ratolins exposats a aquest soroll s'ha observat una disminució del número de cèl·lules ciliades vestibulars, conduint a un deteriorament de l'equilibri (Tamura et al., 2012). A més, s'ha vist que el sàcul té una gran habilitat per respondre a aquests estímuls acústics (Jones et al., 2010).

*“El soroll depèn del silenci del qual procedeix.  
Com més absolut és aquest més escandalós és aquell”*

*Alan Moore*

## 2.5 Ototoxicitat

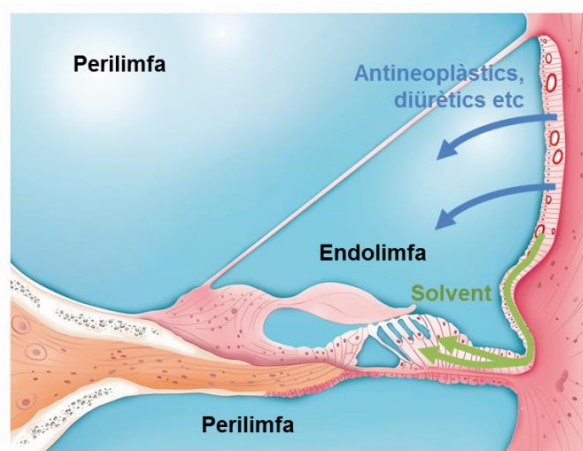
Les substàncies ototòxiques són **substàncies químiques** que tenen un efecte nociu, reversible o irreversible, sobre l'orella interna afectant, per tant, l'audició i/o l'equilibri. Aquestes substàncies poden fins i tot, potenciar l'efecte ja causat pel soroll (Campo et al., 2013; Chen et al., 2007).

### 2.5.1 Substàncies ototòxiques

Les **substàncies ototòxiques (cocleotòxics i/o vestibulotòxics)** són un grup heterogeni de substàncies químiques que provoquen el deteriorament de l'audició i/o l'equilibri a través de diferents modes d'acció. Centenars d'agents químics s'han associat amb efectes ototòxics, incloent classes difuses com "solvents" o "pesticides". Les primeres dades recauen sobre **fàrmacs** (Schacht and Hawkins, 2006). Igualment, substàncies comuns del lloc de treball (**solvents orgànics**, diversos **metalls**, i **asfixiants**) presenten efectes ototòxics (Nies, 2012).

Com hem dit, les substàncies ototòxiques poden causar dany tant al **sistema vestibular** com al **sistema auditiu**. No obstant, s'ha de tenir present que la recerca que es porta a terme en un dels sistemes pot no ser vàlida per l'altre (Lock and Harpur, 1992). La quantitat d'informació disponible per la toxicitat auditiva és molt superior a la disponible per la vestibular, i molts temes investigats a la còclea romanen inexplorats al vestibul (Sedó-Cabezón et al., 2014).

La via per la qual els productes entren dins la **còclea** depèn de la naturalesa de la substància (Fig. I45). Després de la inhalació, totes les substàncies entraran dins la sang i travessaran la barrera hemato-laberíntica a nivell de l'estria vascular. Els productes **hidròfils**, com els fàrmacs, passaran a directament a l'endolimfa, en canvi, els solvents, els quals són **lipòfils**, es dirigiran cap a les cèl·lules ciliades.



**Figura I45.** Vies d'intoxicació portades a terme pels diferents agents ototòxics. Font: INRS.

**Antibiòtics aminoglicòsids:** els antibiòtics aminoglicòsids (estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina i netilmicina) tenen com a efecte secundari la ototoxicitat, tant a nivell auditiu com vestibular. Per tant, aquests components poden ser considerats substàncies químiques cocleotòxiques i vestibulotòxiques que indueixen pèrdues irreversibles. Aquests antibiòtics actuen principalment sobre les CCE (de la primera a la tercera fila) i provoca pèrdues auditives localitzades a les altes freqüències que es propaguen cap a les baixes freqüències depenent de la dosi i la duració de l'exposició (Forge and Schacht, 2000; Rybak and Ramkumar, 2007).

**Antineoplàstics:** Els antineoplàstics són medicaments anticancerosos que tenen efectes ototòxics, són tant cocleotòxics com vestibulotòxics provoquen pèrdues definitives (Macdonald et al., 1994; Montaguti et al., 2002; Schacht et al., 2012; Takimoto et al., 2016). Provoquen una degeneració de l'estria vascular i modifiquen la composició electroquímica dels líquids de l'orella interna (Hamers et al., 2003). Destruïxen igualment els cossos cel·lulars dels ganglis i les cèl·lules ciliades.

**Diürètics:** Els diürètics (àcid etacrínic, furosemida o bumetamida) també tenen propietats ototòxiques, provocant sols problemes auditius, per tant, són substàncies cocleotòxiques. La diana d'aquestes substàncies és l'estria vascular. Alteren la concentració de l'endolimfa ja que modifiquen el funcionament de les bombes iòniques (Ding et al., 2002; Forge, 1982; Forge and Brown, 1982). Les cèl·lules marginals de l'estria augmenten de volum mentre que les cèl·lules intermediàries disminueixen. La sordesa induïda per aquests compostos, principalment en altes freqüències, és sols temporal (Martínez-Rodríguez et al., 2007). A més, tenen la capacitat de potenciar els efectes d'altres agents ototòxics.

**Metalls:** Alguns metalls, com el mercuri, el plom o el cadmi, tenen una acció ototòxica (Araki et al., 1992; Discalzi et al., 1993; Yamamura et al., 1989). Igualment, l'estany i els seus compostos orgànics poden provocar dèficits auditius (Fechter and Carlisle, 1990; Hoeffding and Fechter, 1991; Young and Fechter, 1986). Altres metalls pesats com el germani o el manganès també poden tenir efectes ototòxics (Yamasoba et al., 2006).

**Nitrils:** Els nitrils causen pèrdua de cèl·lules ciliades, tant del vestíbul (Llorens et al., 1993b; Rúa et al., 2013; Sedó-Cabezón et al., 2014) com de la còclea (Balbuena and Llorens, 2003; Crofton et al., 1994; Soler-Martín et al., 2007; Fechter et al., 2004). També provoquen la mort de neurones ganglionars, tant del gangli espiral com del gangli vestibular (Boadas-Vaello et al., 2005; Seoane and Llorens, 2005).

**Asfixiants:** Els asfixiants són capaços de potenciar l'efecte del soroll creant una anòxia a nivell tissular que farà la còclea més vulnerable (Chen and Fechter, 1999; Fechter et al., 2000). Per tant, no es poden considerar cocleotòxics ja que necessiten una co-exposició amb el soroll per produir efectes. La majoria de vegades, l'efecte d'aquests gasos són reversibles.

**Salicilats:** L'àcid acetilsalicílic, conegut com aspirina, i altres antiinflamatoris com l'ibuprofè, generen dèficits auditius temporals i reversibles. L'aspirina modifica l'equilibri iònic necessari per la transducció neurosensorial. També pot modificar els desplaçaments de la membrana basilar i la permeabilitat de la membrana de les CCE (Stypulkowski, 1990).

**Solvents:** Els solvents són coneguts pel seu efecte neurotòxic, encara que alguns són també substàncies ototòxiques. L'ototoxicitat d'aquests solvents va ser descrita als anys 60 (Lehnhardt, 1965), però no va ser clarament demostrada abans de finals del 1980. Els resultats de diferents estudis, tant en humans com en animals, indiquen que l'exposició a **solvents industrials** pot tenir un efecte advers en l'audició i l'equilibri, causant una pèrdua permanent de l'audició i trastorns vestibulars (Hodgkinson and Prasher, 2006; Hoet and Lison, 2008).

Els solvents ataquen en primer lloc les cèl·lules de Hensen, després a les cèl·lules de Deiter i arriben a les CCE a través de la seva cara basal (Campo et al., 1997; Johnson et al., 1988) (Fig. I45). Les cèl·lules del gangli espiral i les CCI solen romandre intactes, ara bé, poden veure's afectades si la dosi és elevada (Campo et al., 1999, 2001; Lataye et al., 2001; Pouyatos et al., 2004). A part, els solvents poden actuar específicament sobre diversos tipus de canals iònics expressats en les neurones (Yamakura et al., 2000) (**efecte neurofarmacològic**). Conseqüentment, aquests solvents poden actuar sobre el ROM.

## 2.5.2 Mecanisme d'ototoxicitat

Els agents ototòxics poden afectar l'òrgan sencer, cèl·lules específiques dins l'òrgan, components específics de les cèl·lules o vies bioquímiques individuals.

Exposicions tant en **animals** (Llorens et al., 1993b; Rubel et al., 2013) com *in vitro* mitjançant cultius d'òrgans de Corti o epitelisvestibulars (Cunningham, 2006; Forge and Li, 2000; Kotecha and Richardson, 1994; Matsui et al., 2004), han mostrat que els components ototòxics poden causar dany permanent ja que causen degeneració de cèl·lules ciliades.

### 2.5.2.1 Vies de mort cel·lular activades pels agents ototòxics

La **necrosis** és un procés incontrolat i passiu que generalment afecta un gran nombre de cèl·lules, mentre que l'**apoptosi** és la mort cel·lular programada, és un procés controlat i depenent d'energia i pot afectar una cèl·lula concreta. L'**extrusió** és la pèrdua de la integritat estructural de l'epiteli, que comença a les terminals nervioses o als contactes cèl·lula-cèl·lula, i provoca una lesió epitelial i la pèrdua de les cèl·lules.

Observacions de l'òrgan de Corti (Forge, 1985) i els òrgans sensorials vestibulars (Li et al., 1995) han provat que la majoria de les cèl·lules ciliades sofreixen **apoptosi** després de l'exposició a agents ototòxics (Schacht et al., 2012), al soroll (Kurabi et al., 2017), o per envelliment (Usami et al., 1997). L'apoptosi és un procés fisiològic que juga un paper crític en la mort cel·lular i l'homeostasis del teixit (Zimmermann et al., 2001; Zimmermann and Green, 2001). En l'apoptosi les cèl·lules activen un programa de mort intracel·lular i s'autoeliminen de manera controlada. Les cèl·lules que moren per apoptosi experimenten canvis morfològics específics; condensació del nucli, fragmentació de la cromatina i formació de cossos apoptòtics sense resposta inflamatòria.

Així i tot, el tipus de mort de les cèl·lules ciliades dels epitelis sensorials coclear i vestibular depèn de la intensitat de l'estímul perjudicial i del tipus d'agent ototòxic. La **necrosis** predomina després de dosis agudes, mentre que l'**apoptosi** predomina després d'exposicions progressives repetides (Sedó-Cabezón et al., 2014). L'**extrusió** és la principal forma associada a l'ototoxicitat crònica de baixa intensitat (Seoane et al., 2001; Seoane and Llorens, 2005). Hi ha dades que indiquen que l'extrusió de les cèl·lules ciliades pot tenir lloc a la còclea dels mamífers, però aquest fenomen no està ben documentat (Corwin et al., 1991; Cotanche, 1987; Seoane et al., 2005; Wersäll et al., 1973; Whitworth et al., 1999).

El manteniment de la homeòstasis davant desafiaments externs, és un procés crucial en la conservació de la integritat de la cèl·lula i la supervivència. Actualment, es creu que la formació de **ROS** és una de les principals causes del desequilibri que pateix la cèl·lula ciliada després d'una exposició a un agent ototòxic (Huang et al., 2000; Schacht et al., 2012).

Igualment, durant la intoxicació a agents ototòxics, a part dels diferents tipus de mort cel·lular, s'expressen moltes altres molècules o biomarcadors i es donen canvis metabòlics que poden derivar a canvis en el nucli, canvis epigenètics o alteracions de l'expressió genètica sense canvis en la seqüència d'àcid desoxiribonucleic (ADN).



### 2.5.2.2 Cèl·lules ganglionars i terminals aferents en el dany ototòxic

La degeneració neuronal és interpretada com una degeneració secundària de les neurones ganglionars causada per la pèrdua del suport tròfic que té lloc després de la degeneració de les cèl·lules ciliades (Ernfors et al., 1996 revisat per Schacht et al., 2012). Així i tot, aquesta degeneració també es pot donar per un dany directe sobre les terminals (Ruan et al., 2014).

Les neurones ganglionars vestibulars sobreviuen més que les neurones espirals després de la pèrdua de les cèl·lules ciliades (Dupont et al., 1993; Jensen, 1983).

### 2.5.2.3 Reparació de l'epiteli sensorial i possible teràpia

Tant en els teixits sensorials auditius com vestibulars dels vertebrats, les cèl·lules de suport tenen la capacitat de reparar una lesió després d'una pèrdua de cèl·lules cilades. Aquest procés apareix com un esdeveniment controlat en el qual totes les cèl·lules que rodegen la cèl·lula ciliada morta participen formant una cicatriu al lloc de la lesió (Forge, 1985; Li et al., 1995; Meiteles and Raphael, 1994; Raphael and Altschuler, 1991; Steyger et al., 1997). Per tant, les cèl·lules de suport recobreixen el forat que s'ha format i preserven la integritat epitelial formant cicatrius característiques que impedeixen l'exposició de la membrana basolateral a l'endolimfa (Leonova and Raphael, 1997).

Un factor important pel manteniment de la integritat del teixit després del dany cel·lular és el tipus de mort de la cèl·lula. Lesions cel·lulars agudes solen derivar cap a una necrosis, la qual cosa fa que es trenqui la barrera permeable entre ambdós líquids de l'orella interna i s'alliberi el contingut cel·lular estimulando respostes inflammatòries, posant en perill la integritat del teixit. Alternativament, durant l'apoptosi, es formen cossos apoptòtics però la membrana roman intacta, evitant tota resposta inflammatòria i preservant la integritat de l'epiteli. Així doncs, l'apoptosi, però també l'extrusió, permeten la preservació de la integritat del teixit per tal de minimitzar el dany i la inflamació local (Hirose et al., 2004; Hordichok and Steyger, 2007; Li et al., 1995; Mangiardi et al., 2004; Seoane et al., 2001).



Les intervencions per atenuar els efectes secundaris ototòxics es basen en l'augment de les vies protectores o la inhibició de les vies de mort cel·lular. Si l'apoptosi és el tipus de mort principal després d'un dany causat per l'exposició a algun agent ototòxic, la inhibició d'aquesta mort cel·lular programada podria ser d'interès terapèutic per tal de prevenir la mort de la cèl·lula ciliada. S'ha trobat que, en algunes situacions, les cèl·lules ciliades són capaces de revertir el dany (Sobkowitz et al., 1997; Staecker and Van De Water, 1998). La inhibició de l'activitat de les caspases pot prevenir l'apoptosi induïda per la intoxicació. Encara que la caspasa-8 i la caspasa-9 representen dues vies de senyalització apoptòtiques diferents, ambdues activen la caspasa-3 (Cheng et al., 2005; Nicotera et al., 2003). Però sols la inhibició de la caspasa-9 arriba a bloquejar l'activació de la caspasa-3 (Cunningham et al., 2002; Tabuchi et al., 2007). Conseqüentment, molts estudis de recerca s'han centrat en la inhibició de la caspasa-9 i la caspasa-3 i les interaccions entre ambdues per tal d'intentar evitar la mort de la cèl·lula (Wang et al., 2004).

### **2.5.3 Co-exposició: els agents ototòxics accentuen el risc induït pel soroll**

Una co-exposició soroll i agent ototòxic pot donar lloc a una **potenciació dels efectes** sobre l'home, generant, a vegades, un efecte patològic superior a la suma dels efectes de cada agent per separat (Campo, 2015; Humes, 1984; Morata et al., 1993; Prosen et al., 1978). Una orella afeblida per un agent ototòxic pot aparèixer més vulnerable a una agressió sonora que una orella exposada sols al soroll. Els efectes tòxics de la co-exposició al soroll i als productes químics són complexos, però molt rellevants quan es tracta d'avaluar el risc dels treballadors.

Trobem una sinèrgia entre els efectes ototòxics del soroll i els **antibiòtics** (Collins, 1988), **antiinflamatoris** (Johnson, 1993), **diürètics** (Vernon et al., 1977), **nitrils** (Pouyatos et al., 2005), **asfixiants** (Lacerda et al., 2005) i alguns **metalls** (Nikolov, 1974).

Igualment, existeix un risc real de potenciació dels efectes del soroll pels **solvents**, i viceversa, tant en l'audició (Lataye et al., 2000; Lataye and Campo, 1997) com en l'equilibri (Morata et al., 1995). Els efectes de la co-exposició al soroll i a un solvent aromàtic han estat ben estudiats en la rata (Campo et al., 2013; Chen and Henderson, 2009; Venet et al., 2015). A més, la combinació de dos solvents pot augmentar els efectes tòxics (Pryor et al., 1987).

Diversos estudis han demostrat que els solvents poden tenir un efecte farmacològic sobre el nucli olivococlear. Aquests efectes expliquen, almenys en part, els efectes sinèrgics en l'audició de l'exposició combinada “soroll i solvent” (Campo et al., 2007; Venet et al., 2015, 2011; Wathier et al., 2016).

La mesura del reflex acústic suggereix que tant el lloc com el mecanisme subjacent de les lesions és diferent quan hi ha una co-exposició que quan els agents es troben sols (Morata et al., 1993).

*“Com a resultat de treballar amb substàncies tant tòxiques  
les nostres ments s’han ennuvolat tant que hem perdut tot escripol”*

*Otto Hahn*

## 2.6 Disulfur de carboni

El **disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>)**, en estat pur, és un líquid incolor amb una olor forta i dolça, mentre que en estat impur, com s'utilitza en la majoria del processos industrials, és un líquid groguenc amb una olor desagradable. És un producte molt volàtil, inflamable i explosiu.

### 2.6.1 Producció i ús del CS<sub>2</sub>

La producció mundial mitjana de CS<sub>2</sub> és d'aproximadament 1 milió de tones/any. Igualment, el CS<sub>2</sub> s'allibera de manera natural pel sòl i microorganismes, la vegetació, els volcans...

El CS<sub>2</sub> és un **producte químic industrial** important gràcies a les seves propietats, incloent la seva capacitat de solubilitzar les grasses, la goma, i el fòsfor, entre altres. També s'utilitza com intermediari de la síntesi de productes orgànics de sofre com pesticides, productes farmacèutics, colorants i acceleradors de la vulcanització. Però el seu ús principal dins la indústria és la fabricació de fibres de viscose, films de cel·lofana i esponges.

### 2.6.2 Fonts del CS<sub>2</sub> i possible exposició

Les fonts del CS<sub>2</sub> poden ser antropològiques, principalment pel seu ús industrial, o naturals ja que trobem alguns bacteris que alliberen CS<sub>2</sub> a causa de la seva acció metabòlica.

El CS<sub>2</sub> és un solvent mòbil que no es conserva al sòl ja que es volatiliza ràpidament a l'atmosfera, encara que una petita part restant pot desembocar a les aigües subterrànies. Una vegada es troba en l'atmosfera, aquest compost queda pròxim a la terra ja que és més dens que l'aire i es disgrega en components més simples després d'un cert temps.

L'exposició de l'ésser humà al CS<sub>2</sub> es porta a terme a través de l'aire, la beguda i el menjar o, fins i tot, la pell. Així i tot, la principal via d'exposició és per inhalació, on el CS<sub>2</sub> entra ràpidament al torrent sanguini a través dels pulmons.

### 2.6.3 Cinètica i metabolisme del CS<sub>2</sub>

Les dades disponibles en estudis humans i animals indiquen que el CS<sub>2</sub> és ràpidament **absorbit** per inhalació, via oral o l'epidermis. Aquest CS<sub>2</sub> absorbit és **distribuït** ràpidament cap a totes les parts del cos a través de la sang. A causa de la seva naturalesa lipòfila, s'uneix fàcilment en òrgans amb alt contingut de greix com el cervell i el fetge, on és **metabolitzat**. La principal via d'**excreció** dels metabòlits de CS<sub>2</sub> és a través de l'orina. Igualment, el CS<sub>2</sub> no metabolitzat és excretat per exhalació o, fins i tot, per l'orina.

#### 2.6.3.1 Absorció

Aproximadament el 80 % del CS<sub>2</sub> inhalat es conserva durant els primers 15 min d'exposició, però disminueix a un 40 % després de 40 min. El percentatge de retenció no depèn de la concentració del tòxic. Pel que fa al CS<sub>2</sub> administrat oralment, s'ha observat que una gran part és absorbit, i, a més, l'assimilació d'aquest solvent a través de la pell és ràpida i elevada.

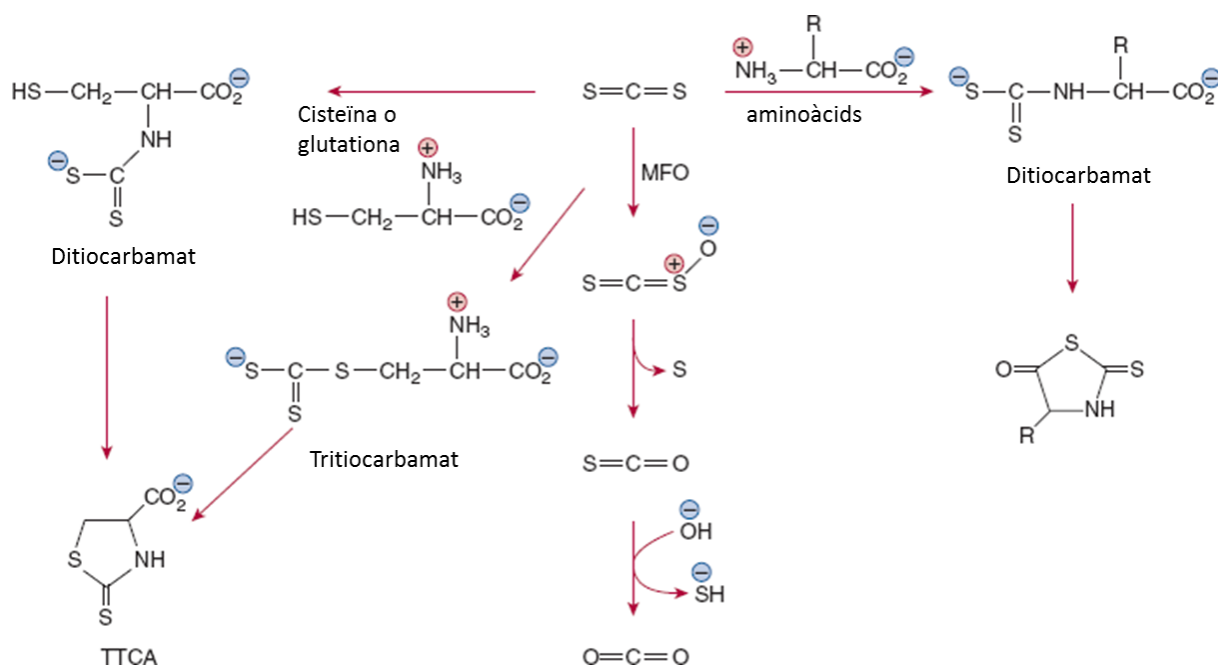
#### 2.6.3.2 Distribució

Després de l'absorció, el CS<sub>2</sub> es transporta dins la sang a través dels eritròcits (90 %) i el plasma (10 % unit a proteïnes), d'on desapareix relativament ràpid ja que és distribuït als diferents òrgans i teixits (Brieger, 1967; Lam and DiStefano, 1983; McKee, 1942). Dins la sang, el nivell de CS<sub>2</sub> augmenta de manera exponencial durant els primers 90 min d'exposició i després es manté constant. Una vegada la intoxicació acaba, el nivell de CS<sub>2</sub> lliure disminueix ràpidament; el 40 % es perd durant els primers 6 min i la seva completa eliminació es fa entre 5-7 hores (McKenna and DiStefano, 1977a). A causa de la seva naturalesa lipòfila, la seva distribució és major en teixits rics en lípids com el cervell i el fetge, on és metabolitzat. En tots els teixits, menys en el greix, la concentració de CS<sub>2</sub> lliure arriba a estabilitzar-se després de 4-5 h d'exposició. No obstant això, el nivell de CS<sub>2</sub> unit als teixits continua augmentant després d'acabar l'exposició (McKenna and DiStefano, 1977a).

### 2.6.3.3 Metabolisme

El CS<sub>2</sub> és metabolitzat a través de dues vies diferents. La primera depèn de la seva capacitat per reaccionar amb amines lliures o aminoàcids i grups tiol (-SH) (Fig. I46). Els productes d'aquestes reaccions són **ditiocarbamats** (reacció amb grups amina) i **tritiocarbamats** (reacció amb grups tiol) (Bus, 1985). Aquesta unió forma el que s'anomena **CS<sub>2</sub> unit**. Ambdós metabòlits no són volàtils, però sí solubles en aigua (Brieger, 1967). La distribució del **CS<sub>2</sub> unit** és diferent que la del **CS<sub>2</sub> lliure**. A la majoria de teixits la concentració de CS<sub>2</sub> unit és major que la del lliure (McKenna and DiStefano, 1977a).

La segona via metabòlica inclou el **metabolisme microsomal oxidatiu** del CS<sub>2</sub>, on reactius intermediaris són capaços d'unir-se covalentment a macromolècules del teixit. Aquest metabolisme oxidatiu que es dona al fetge metabolitza el CS<sub>2</sub> a través del **citocrom P-450** per l'oxidasa de funció mixta. Aquest sistema catalitza la di-sulfuració oxidativa del CS<sub>2</sub> a un oxigen intermediari estable, el carbonil sulfit, que és l'intermediari de la posterior formació del CO<sub>2</sub> (Bus, 1985) (Fig. I46).



**Figura I46.** Metabolisme del disulfur de carboni. Per una banda, el disulfur de carboni és metabolitzat per la oxidasa de funció mixta (MFO) del citocrom P450 a carbonil sulfit, sulfur atòmic i HS<sup>-</sup>. Per altra banda, la reacció del disulfur de carboni amb cisteïna o glutatona genera tritiocarbamats, que es poden ciclar per formar àcid thiazolidina-2-thion-4-carboxilic (TTCA). I, finalment, la reacció del disulfur de carboni amb grups amina dels aminoàcids dona derivats de ditiocarbamats, que també es poden ciclar i formar 2-thio-5-thiazolidiones. Font: imatge adaptada de Graham et al.,1995.

#### 2.6.3.4 Excreció

L'eliminació del CS<sub>2</sub> lliure es fa principalment a través dels pulmons (expiració), i, fins i tot, una petita part a través dels ronyons (orina). En acabar l'exposició, la concentració de CS<sub>2</sub> lliure disminueix de manera dràstica i ràpida, fent que 8 h després sols es trobin entre un 25 i un 30 % (McKenna and DiStefano, 1977a).

Per altra banda, l'excreció del CS<sub>2</sub> unit es produeix a través de l'orina, de manera més lenta, amb una vida mitjana entre 2,2 i 42,7 h en rates (Lam and DiStefano, 1982). Per tant, la taxa d'eliminació del CS<sub>2</sub> unit és més lenta que la del CS<sub>2</sub> lliure.

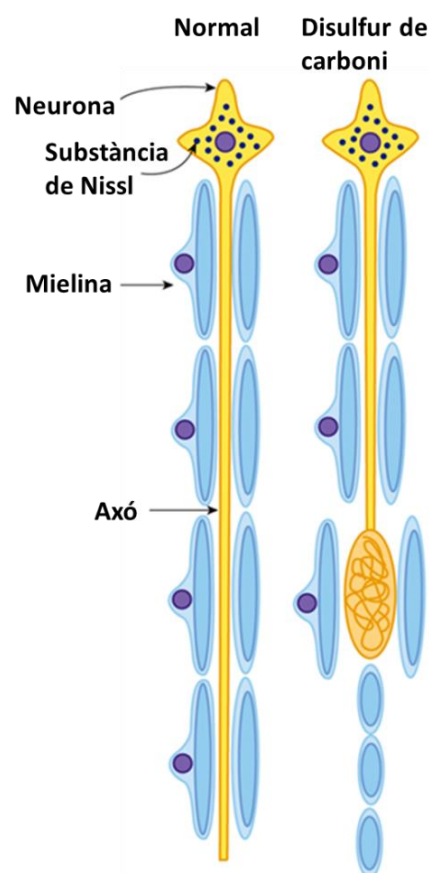
#### 2.6.4 Efectes sobre la salut: toxicitat del CS<sub>2</sub>

En altes concentracions, el CS<sub>2</sub> pot afectar diferents aparells i òrgans del cos. Afecta al **sistema nerviós**, la qual cosa es desenvoluparà més endavant, i, per conseqüent, als **sistemes sensorials**. Diferents estudis en animals demostren que el CS<sub>2</sub> afecta a la **vista** ja que s'observen canvis en les neurones ganglionars de la retina, provoca una degeneració vascular i una reducció de la velocitat de conducció dels nervis en la via òptica (Beauchamp et al., 1983; Rebert and Becker, 1986).

Molts estudis demostren el seu efecte sobre el **sistema cardiovascular** tant en animals, ja que trobem alteracions en el miocardi, aterosclerosi i augment de la pressió sanguínia, entre altres (Hoffmann and Klapperstück, 1990; Hoffmann and Müller, 1990; Klapperstück et al., 1991), com en humans, on trobem un augment del risc de patir una malaltia coronària i d'hipertensió (Chang et al., 2007; Kotseva et al., 2001; Sulsky et al., 2002). També poden trobar dany en les **estructures endocrines** en animals exposats al CS<sub>2</sub> (Keil et al., 1996). Igualment, en estudis dels humans, trobem una disminució en l'excreció d'algunes hormones (Cavalleri et al., 1970). Diferents estudis en animals han demostrat **efectes renals** del CS<sub>2</sub> i, fins i tot, algun efecte sobre el **fetge** (Masuda et al., 1986). Finalment, l'exposició de rates al CS<sub>2</sub> pot provocar desordres al **sistema reproductor**, disminuint la viabilitat del fetus, la talla i el desenvolupament, entre altres (Iaroslavskiï, 1969). En humans també trobem desordres en el funcionament d'aquest sistema (Vasiljeva, 1973).

## 2.6.5 Neurotoxicitat del CS<sub>2</sub>

En exposicions agudes o subagudes de CS<sub>2</sub> en **animals d'experimentació**, els efectes sobre el sistema nerviós són els primers en aparèixer. El CS<sub>2</sub> és capaç de produir **neuropatia central i perifèrica** (Dietzmann and Laass, 1977; Richter, 1945). Diverses substàncies químiques neurotòxiques indueixen una acumulació i una unió anormal de **neurofilaments** causant un inflament dels axons (Fig. I47). Aquesta patologia està associada amb la degeneració de l'axó i, conseqüentment, una debilitat muscular (Monaco et al., 1990; Spencer and Schaumburg, 1977a, 1977b, 1977c). La neuropatia causada pel CS<sub>2</sub> progressa en una seqüència disto-proximal i afecte als axons llargs del SNC i al sistema nerviós perifèric (Gottfried et al., 1985; Graham et al., 1995; Llorens, 2013; Sills et al., 2000). En el cas del CS<sub>2</sub> es tracta d'una **axonopatia neurofilamentosa distal** (Colombi et al., 1981; Pappolla et al., 1987). Aquest inflament dels axons és el primer canvi histològic evident, després es produeix l'acumulació i degeneració dels orgànuls axoplasmàtics, seguit per la fragmentació i degradació de les fibres i, finalment, la reducció i la destrucció de la beina de mielina (Knobloch et al., 1979; Sills et al., 1998).



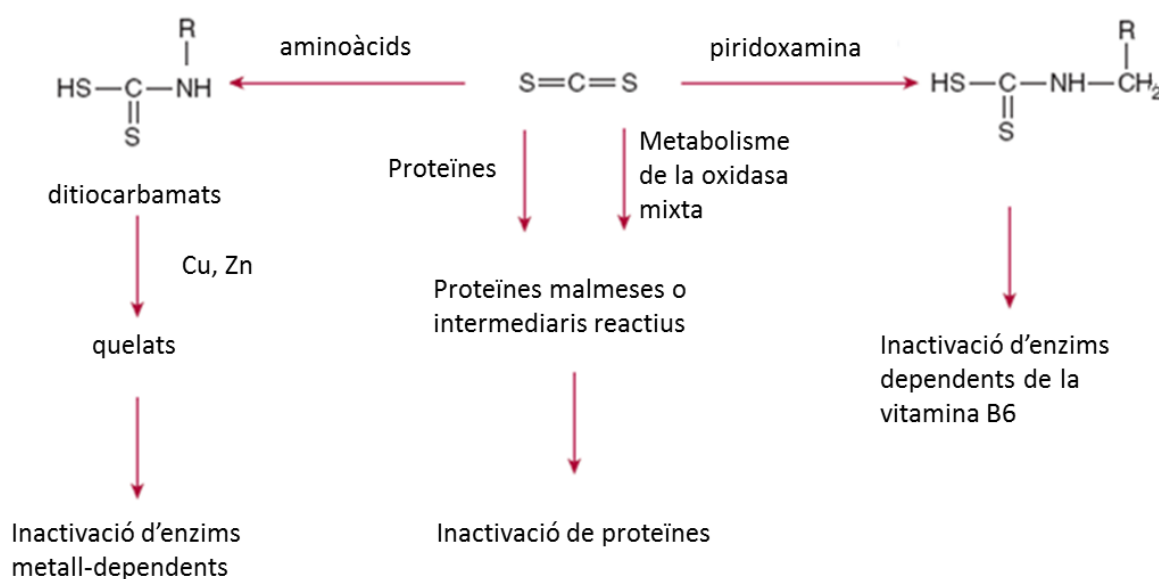
**Figura I47.** Axonopatia neurofilamentosa. Inflament en la part distal de l'axó causat per un augment i agrupament de neurofilaments, seguit per una degeneració de l'axó. Font: imatge adaptada de Manual de Toxicologia. Curtis Klaassen, John.

Aquests canvis provoquen la disminució en la **velocitat de conducció dels nervis**, la qual està relacionada amb la concentració de CS<sub>2</sub> i la duració de l'exposició (Knobloch et al., 1979; Lukas, 1970). La velocitat de conducció dels nervis perifèrics es pot veure completament recuperada si el període d'exposició ha estat relativament curt. Ara bé, quan aquesta es produeix durant un llarg període de temps, la neuropatia és irreparable i la reducció en la velocitat de conducció d'aquests nervis és irreversible (Knobloch et al., 1979). Mentre que els nervis perifèrics tenen una capacitat de regeneració, la degeneració axonal en el SNC és irreversible (Spencer and Schaumburg, 1980).

Canvis en el **comportament** de les rates han estat observats en diferents estudis d'exposició al CS<sub>2</sub>. Igualment, s'han trobat canvis **neuromusculars** que afecten l'activitat locomotora dels animals (Frantík, 1970; Moser et al., 1998; Opacka et al., 1984).

Igualment, en estudis en **humans**, trobem un efecte neurofisiològic, tant en el SNC com en el sistema nerviós perifèric, així com efectes en el comportament. S'han detectat reduccions en la velocitat de conducció dels nervis perifèrics (Hirata et al., 1996; Ruijten et al., 1993; Sandrini et al., 1983; Takebayashi et al., 1998; Vasilescu and Florescu, 1980), perturbacions psicològiques i desordres comportamentals (De Fruyt et al., 1998; Hänninen, 1971; Hänninen et al., 1978; Tolonen and Hänninen, 1978). A més, s'han observat canvis ultraestructurals al sistema nerviós perifèric igual que els observats en animals exposats al CS<sub>2</sub>; degeneració axonal amb desorganització dels neurofilaments (Chu et al., 1996).

Des d'un punt de vista **metabòlic**, trobem tres mecanismes que poden estar involucrats amb la neurotoxicitat del CS<sub>2</sub> (Graham et al., 1995) (Fig. I49). 1) Els ditiocarbamats que es formen poden produir quelats, els quals són capaços d'inhibir un important número d'enzims metabòlics. 2) El CS<sub>2</sub> pot reaccionar amb l'amina lliure del grup piridoxamina, induint deficiència de vitamina B6 i, per tant, causant la inactivació d'enzims dependents d'aquesta vitamina. 3) El CS<sub>2</sub> de manera directa pot inactivar proteïnes a causa de la reacció amb grups tiol i algunes proteïnes, o per la reacció de metabòlits oxidatius amb proteïnes.



**Figura I49.** Mecanismes metabòlics del disulfur de carboni que induïxen neurotoxicitat.



### **2.6.6 Ototoxicitat del CS<sub>2</sub>**

S'han trobat canvis en la velocitat de conducció dels nervis de la via central auditiva amb un patró retrococlear en rates exposades al CS<sub>2</sub> (Rebert et al., 1986). Igualment, trobem un increment en la latència d'alguns components del potencial evocat auditiu en aquests animals (Hirata et al., 1992a; Rebert and Becker, 1986). Contràriament, no es va observar cap efecte significatiu en els llindars de tons purs de rates exposades al CS<sub>2</sub>, suggerint doncs, que l'ototoxicitat primària del CS<sub>2</sub> es dona sols quan aquest es troba juntament amb soroll (Clerici and Fechter, 1991). Els efectes de l'exposició o la co-exposició del CS<sub>2</sub> en el sistema vestibular no han estat ben documentats en els animals.

Treballadors co-exposats al solvent i al soroll van manifestar una anticipació de l'aparició de pèrdua auditiva, si es comparen als exposats al soroll sol (Morata, 1989). Igualment, també es va trobar un augment de problemes d'equilibri (Sułkowski et al., 1992). Es va trobar una pèrdua auditiva retrococlear bilateral associada amb disfuncions centrals del sistema vestibular (Kowalska et al., 2000). Aquest dany vestibular causat per la intoxicació del CS<sub>2</sub> es dona a nivell central (Sułkowski et al., 1992). Chang et al., 2003 suggereix que l'exposició al CS<sub>2</sub> genera de manera dosi-dependent un trauma auditiu en humans quan es troben en un ambient sorollós, i afecte sobretot a les **baixes freqüències**.

*“Totes les coses són un verí i res existeix sense verí,  
a penes una dosi i raó perquè una cosa no sigui un verí”*

*Paracels*

### **3 . OBJECTIUS**



L'objectiu principal del projecte és l'estudi de la toxicitat auditiva i la toxicitat vestibular d'una co-exposició d'un soroll ric en baixes freqüències i un solvent, el CS<sub>2</sub>. Aquest estudi vol avançar en el coneixement del dany i la possible reparació de la funció auditiva i vestibular, quan ens trobem davant una exposició conjunta d'un soroll amb un solvent potencialment ototòxic.

Els objectius concrets per a aquest treball de tesi són:

1. Demostrar i caracteritzar la ototoxicitat del CS<sub>2</sub> en rates Long-Evans. Estudiar si existeix una toxicitat a nivell del sistema nerviós central i/o a nivell dels òrgans perifèrics.
2. Avaluar si la toxicitat del CS<sub>2</sub> és similar i/o comparable a nivell del sistema auditiu i el sistema vestibular.
3. Analitzar si la combinació soroll i CS<sub>2</sub> augmenta l'efecte nociu o genera una afectació d'ambdós sistemes, auditiu i vestibular.
4. Comparar l'impacte del CS<sub>2</sub> sobre l'audició i sobre l'equilibri a diferents dosis i diferents modes d'exposició (contínua o intermitent). A més, analitzar si una mateixa dosis final de CS<sub>2</sub> té el mateix impacte quan aquesta s'administra de manera contínua o intermitent.
5. Establir una relació entre les conseqüències d'aquest efecte tòxic en termes funcionals (comportament, nistagme vestibular i productes de distorsió acústics) i patològics (histològics).
6. Valorar i estimar a partir de quan la disfunció serà persistent o estarà seguida d'una recuperació funcional.



## **4 . MATERIAL I MÈTODES**



## 4.1 Animals

Els experiments es van portar a terme a la Unitat d'Experimentació Animal de l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité, Vandoeuvre-lès-Nancy, France), acreditat com a lloc d'experimentació animal pel Ministeri d'Agricultura Francès (C54-547-10). L'ús i el tractament dels animals es va fer d'acord amb la guia per la cura i ús d'animals de laboratori emesa per la Directiva del Parlament Europeu (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010), sota l'aprovació del *Comité d'éthique Lorrain pour l'expérimentation animale* (CELMEA) i del Ministeri d'Educació i Recerca Francès (APAFIS#3950-201602051 1372481).

El model animal per portar a terme l'estudi van ser les **rates Long-Evans femelles**. A causa de les conseqüències irreversibles del CS<sub>2</sub> sobre el SNC i els efectes del soroll sobre la còclea, només són possibles les investigacions dutes a terme amb un model animal. Es va escollir la rata perquè molts dels estudis d'ototoxicitat es realitzen amb aquests animals. Encara que la gamma de freqüències audible per aquesta espècie, situada entre 250 Hz i 65 kHz, (Fay, 1988; Kelly and Masterton, 1977) amb una sensibilitat màxima al voltant de 8 kHz, és diferent de la dels humans (0,2 a 20 kHz, amb sensibilitat màxima a 3-4 kHz), els efectes de l'ototoxicitat es manifesten a ambdues espècies (Vyskocil et al., 2012). A més, els humans i les rates presenten un metabolisme pels solvents similar (Pelekis and Krishnan, 1997). Les rates Long-Evans, van ser escollides per la seva coloració a nivell de l'estria vascular, i es caracteritzen per tenir grans amplituds del ROM i del ROI. S'han utilitzat femelles per seva talla, per tal de portar a terme tots els experiments i tècniques de la manera més confortable i assequible possible i perquè toleren bé el mètode de restricció, a part de tenir unes pupil·les idònies per la mesura del nistagme (Quinn et al., 1998).

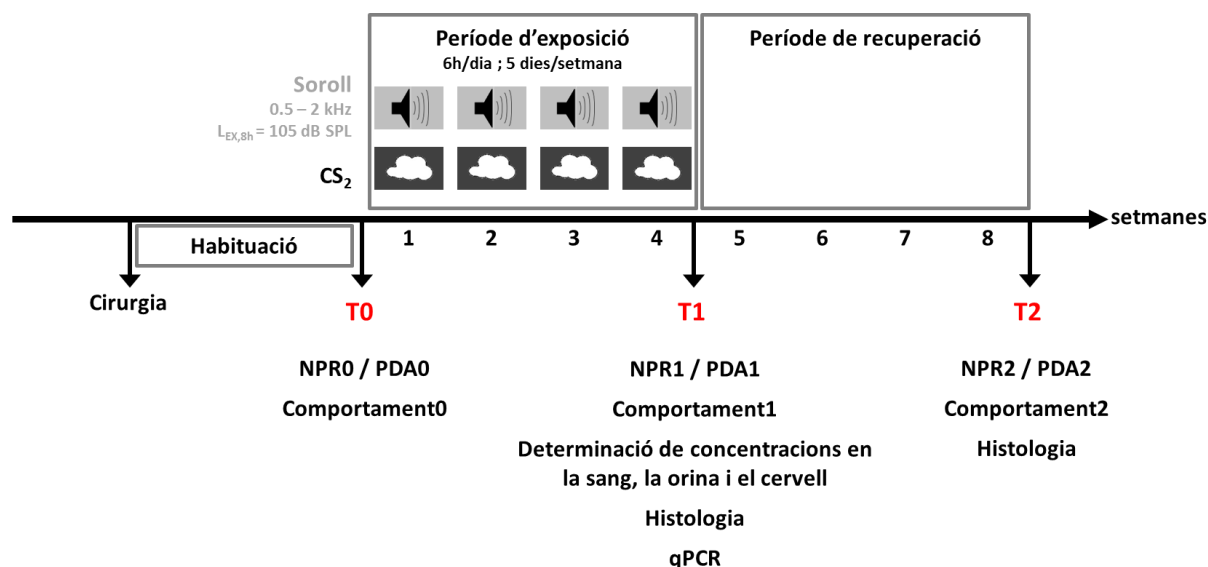
Es van utilitzar diferents grups de rates Long-Evans femelles d'uns 250 g ( $n = 390$ ) que provenien dels Laboratoris Janvier (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Un cop les rates van arribar a l'estabulari, amb 8 setmanes, van passar un període de quarantena. Els animals tenien 18 setmanes en el moment de començar l'exposició. Es van estabular dues rates per gàbia (1032 cm<sup>2</sup> x 20 cm d'altura) de policarbonat de cel·lulosa BCell8 irradiat (ANIBED, Pontvallain, France). Menjar i aigua *ad libitum* excepte durant els períodes d'exposició. L'estabulari es va mantenir en un fotoperíode de 12 h llum / 12 h fosc (7 h - 19 h), una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i una humitat relativa de  $50 \pm 10\%$ . El soroll de fons dins l'estabulari era del voltant de 42 dB.



## 4.2 Protocol experimental

Trobem dos protocols experimentals diferents.

Per una part, els animals van ser exposats a **soroll ric en baixes freqüències i/o al CS<sub>2</sub>**, 6 h per dia, 5 dies consecutius per setmana, durant 4 setmanes, amb un període de recuperació de 4 setmanes més (Fig. M1).



**Figura M1.** Protocol experimental 1. Exposicions al disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>) i/o soroll durant 6 h/dia, 5 dies/setmana, durant 4 setmanes. La  $L_{EX,8h}$  del soroll era de 105 dB SPL i l'espectre era d'entre 0,5 i 2 kHz. L'exposició del CS<sub>2</sub> es produïa de manera contínua a diferents concentracions (63, 250, 500 ppm), o de manera intermitent (1 o 2 pics de 15 min/h a 250 ppm de CS<sub>2</sub>). T0: abans de l'exposició. T1: al final de l'exposició. T2: després del període de recuperació. Abans de realitzar les primeres mesures, es va implantar un cas de contenció als animals, seguit d'un període d'habitució. L'audició va ser mesurada utilitzant les emissions dels productes de distorsió oto-acústics (PDA). Igualment, la funció vestibular es va analitzar a través de la mesura del nistagme post-rotatori (NPR) i a través d'una bateria de tests de comportament. Es van extreure mostres de sang i orina i cervells al final de l'exposició per tal d'analitzar la concentració del tòxic. Finalment, es van portar a terme anàlisis histològics i una reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR) sobre el cervell en sortir de l'exposició.

L'**exposició al soroll** va ser contínua. L'espectre del soroll es troba dins el rang de 0,5 a 2 kHz, i amb una intensitat de 106 dB SPL, la qual és equivalent a una  $L_{EX,8h}$  de 105 dB SPL. Pel que fa a l'**exposició del CS<sub>2</sub>**, pel tal d'estudiar l'efecte dosis-resposta, els animals varen ser exposats a 63, 250 i 500 ppm de manera contínua. D'altra banda, per analitzar la diferència entre una exposició de CS<sub>2</sub> contínua i una exposició intermitent, les rates van ser exposades a 250 ppm durant 15 min cada hora (6 pics de 15 min per dia), deixant 45 min d'aire pur entre dos pics o a 250 ppm durant 15 min cada 30 min (12 pics de 15 min per dia), deixant 15 min d'aire pur entre dos pics.

El nombre d'animals utilitzat en cada grup experimental es troba a la Taula M1, juntament amb el nombre de rates per a cada mesura i tècnica histològica.

Es van portar a terme diverses mesures per tal d'avaluar el funcionament del sistema vestibular i el sistema auditiu. Aquestes mesures es van realitzar abans de l'exposició (T0), al final de l'exposició (T1), i 4 setmanes després de la recuperació (T2). La funció vestibular es va analitzar a través de la mesura del **nistagme post-rotatori (NPR)** i l'estudi de diferents **tests comportamentals**. Abans de realitzar les primeres mesures, es va implantar un casc de contenció al crani de l'animal per tal de bloquejar el cap d'aquest durant l'enregistrament del NPR, seguit d'un període d'habitució per tal d'acostumar-los a romandre tranquils durant aquestes mesures. L'audició de les rates es va mesurar per les emissions dels **productes de distorsió acústics (PDA)**.

Mostres d'orina i de sang es van recol·lectar al final de l'exposició per tal d'analitzar la **concentració d'àcid 2-thioxotiazolina-4-carboxilic (TTCA)** i la **concentració de CS<sub>2</sub>**, respectivament. Igualment, es va extreure el cervell d'alguns animals per determinar la **concentració de CS<sub>2</sub>** present.

Al final de l'exposició i després de la recuperació, es van observar els **neuroepitelis auditius i vestibulars** i els respectius **ganglis**, a través del microscopi òptic (MO), microscopi òptic de fluorescència confocal i el microscopi electrònic de rastreig (MER).

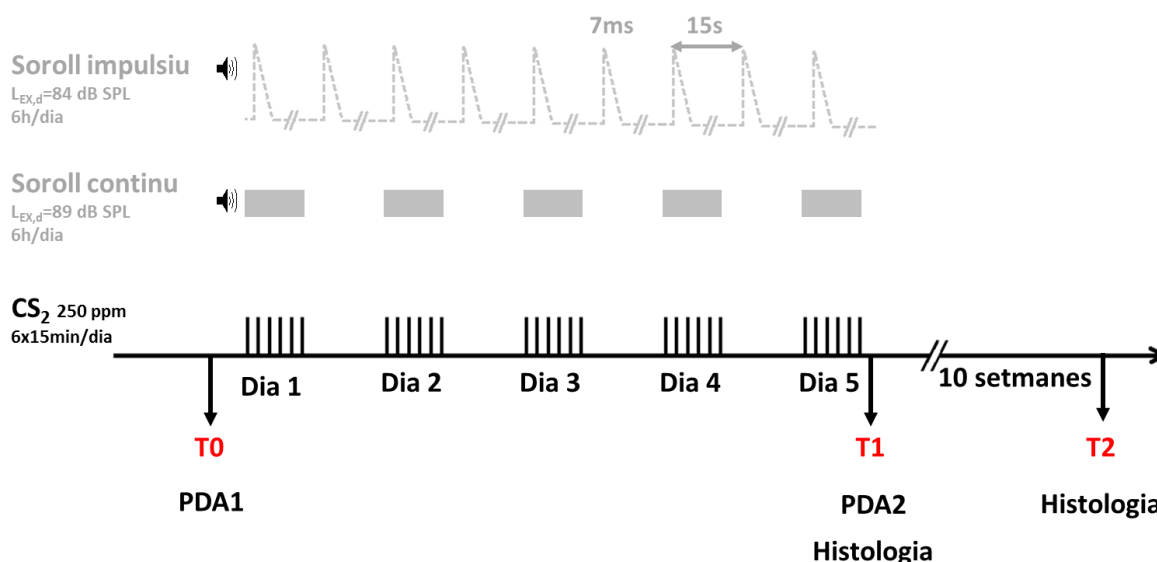
Finalment, es va realitzar una **reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR)** sobre el cerebel d'alguns animals, en sortir de l'exposició, per tal de posar en evidència l'expressió d'alguns gens marcadors de neurotoxicitat.

	Total	PDA			NPR			Comportament			MO	IHQ	MER	SDH	qPCR
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T1 - T2	T1 - T2	T2	T2	T1
BF	40	13			13			8			9 - 6	4 - 4	5	7	/
250 ppm CS <sub>2</sub>	16	/			8			8			5 - 5	3 - 3	/	/	/
BF + 63 ppm CS <sub>2</sub>	8	8			8			/			/ - 4	/	4	4	/
BF + 250 ppm CS <sub>2</sub>	36	13			15			8			4 - 8	8 - 6	6	4	8
BF + 500 ppm CS <sub>2</sub>	8	8			8			8			/ - 4	/	4	4	/
BF + 1x15min/h 250 ppm CS <sub>2</sub>	32	10			13			8			9 - 10	/	5	8	/
BF + 2x15min/h 250 ppm CS <sub>2</sub>	22	11			10			/			/	/	/	/	/
Control	150	53			61			30			21 - 33	15 - 10	19	22	8

**Taula M1.** Nombre d'animals exposats i controls per cada grup experimental. Es van poder portar a terme diverses tècniques experimentals a un mateix animal. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni; BF: soroll de baixa freqüència; PDA: productes de distorsió acústics; NPR: nistagme post-rotatori; MO: microscòpia òptica; IHQ: immunohistoquímica; MER: microscopi electrònic de rastreig; SDH: succinat deshidrogenasa; qPCR: reacció en cadena de la polimerasa quantitativa; T0: abans de l'exposició; T1: al final de l'exposició; T2: 4 setmanes després de l'exposició.

Per altra banda, una part dels animals van ser exposats a **diferents tipus de soroll (impulsiu vs. continu) i/o a CS<sub>2</sub>**, 6 h per dia, durant 5 dies consecutius (Fig. M2).

El nombre d'animals per a cada grup experimental es troba representat a la Taula M2, juntament amb el nombre de rates per a cada mesura i tècnica histològica.



**Figura M2.** Protocol experimental 2. Els animals són exposats durant 5 dies consecutius 6 h/dia. Exposició al disulfur de carboni (CS<sub>2</sub>): cada barra representa un període d'exposició de 15 min a 250 ppm. Exposició continu a soroll: cada rectangle gris representa un període de 6 h de soroll continu amb un L<sub>EX,8h</sub> de 89 dB SPL. Exposició al soroll impulsiu: la línia discontinua representa l'estructura temporal de l'emissió del soroll impulsiu. Cada 7 ms d'emissió de soroll estaven separats per 15 s, i aquesta seqüència es va repetir durant 6 h. L'audició va ser mesurada utilitzant les emissions dels productes de distorsió acústics (PDA). Les rates van ser sacrificades per portar a terme estudis histològics al final de l'exposició o 10 setmanes després. T0: abans de l'exposició. T1: al final de l'exposició. T2: després del període de recuperació.

Pel que fa al CS<sub>2</sub>, les rates van ser exposades a 250 ppm durant 15min per hora (6 pics de 15 min per dia), deixant 45 min d'exposició a aire pur.

Per altra banda, l'espectre del **soroll** era d'una banda d'octava centrat a 8 kHz. La L<sub>EX,8h</sub> pel soroll continu i impulsiu era de 89 i 84 dB SPL, respectivament. Pel soroll impulsiu, la duració de cada pic era de 7 ms, amb 15 s de soroll de fons entre dos pics.

L'audició de les rates es va mesurar per les emissions dels **PDA**, abans (PDA0) i després dels 5 dies d'exposició (PDA1). Al final de l'exposició, es va observar l'estat dels estereocilis de la còclea, a través del **MER**. Finalment, es van deixar 10 setmanes de recuperació, i es fa un recompte de cèl·lules ciliades de la còclea, a través de la tècnica del marcatge amb **succinat deshidrogenasa (SDH)**.

		PDA	MER	SDH
	Total	T0 T1	T1	T2
1x15min/h 250 ppm CS <sub>2</sub>	16	8	3	5
SC	8	8	3	5
SC + 1x15min/h 250 ppm CS <sub>2</sub>	8	8	3	5
SI	8	8	3	5
SI + 1x15min/h 250 ppm CS <sub>2</sub>	8	8	3	5
Control	30	18	9	12

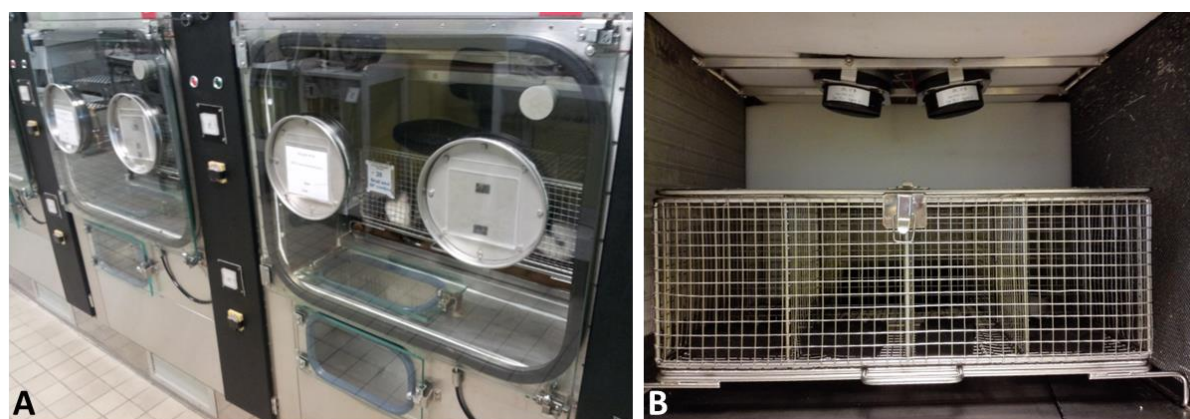
**Taula M2.** Nombre d'animals exposats i controls per cada grup experimental. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni; SC: soroll continu; SI: soroll impulsiu; PDA: productes de distorsió acústics; MER: microscopi electrònic de rastreig; SDH: succinat deshidrogenasa; T0: abans de l'exposició; T1: al final de l'exposició; T2: 10 setmanes després de l'exposició.

Cada setmana es pesaven els animals i s'avaluava l'estat de salut o de benestar general d'aquests, basada en el protocol de supervisió de Morton and Griffiths, 1985 (Annex 1).

## 4.3 Exposició

L'exposició dels animals es va realitzar dins cambres d'inhalació de 200 L, dissenyades per tolerar un flux d'aire dinàmic i ajustable (5-6 m<sup>3</sup>/h) (Fig. M3A). A cada cambra es va col·locar una gàbia d'acer inoxidable dividida en vuit compartiments (130 x 92 x 200 mm) on es situaven els animals individualment (Fig. M3B). Les cambres es mantenen a una pressió negativa inferior a 3 mm H<sub>2</sub>O per tal d'evitar fuites del tòxic a l'exterior. L'aire entrant es filtrava i s'administrava a una temperatura de 22 ± 1°C i una humitat relativa de 55 ± 10 %.

Durant el període d'exposició, tant els animals intoxicats com els animals control no disposaven d'aigua ni de menjar.



**Figura M3.** Exposició dels animals. (A) Cambres d'inhalació de 200 L. (B) Gàbia dividida en 8 compartiments on es situen els animals i on es pot veure dos altaveus per la generació del soroll.

### 4.3.1 Exposició al CS<sub>2</sub>

Els vapors de CS<sub>2</sub> es van generar a través d'una columna de vidre amb una temperatura regulada. El CS<sub>2</sub> es va distribuir a través d'una bomba, vaporitzant-se de manera instantània quan entrava en contacte amb la superfície escalfada. Els vapors van ser transportats a través de la columna, amb un flux d'aire constant, fins a les cambres d'exposició.

Els animals es van exposar a diferents concentracions de CS<sub>2</sub> de manera contínua durant 6 h (63, 250 o 500 ppm), o de manera intermitent (15 min cada hora o 15 min cada 30 min). Igualment, les rates controls es trobaven en cambres ventilades amb aire fresc.

#### 4.3.1.1 Anàlisi de la concentració de CS<sub>2</sub>

La concentració de solvent a l'interior de les cambres s'anava controlant mitjançant la recollida de mostres d'aire (3 vegades/dia per cambra) a través de tubs de vidre plens de carbó actiu (Carboxen 1000, malla de 40/60, Supelco).

Després de la desorció del CS<sub>2</sub> amb clorur de metilè (DCM), les mostres s'analitzaven per cromatografia de gasos (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu), utilitzant metiletilcetona (MEK) com a estàndard intern. Les mostres de CS<sub>2</sub> es van analitzar en una columna RTX-1701 de 30 m i 0,25 mm (gruix de la pel·lícula 1 mm) (Restek), utilitzant heli com a gas transportador, a una velocitat lineal de 45 cm/s. La temperatura de la columna es va programar a 40°C durant 3 min seguit d'un augment fins a 100°C (increment de 20°C/min). La mostra (1 µl) s'injecta amb "split mode", amb una split ratio de 1/30 fraccionada. La temperatura pel port d'injecció, la línia de transferència i la font de ions es fixen a 240°C, 250°C i 200°C, respectivament. L'espectrometria de masses funciona per ionització d'electrons (70 eV) monitoritzant els ions seleccionats; 43 per l'estàndard intern (MEK) i 76 pel CS<sub>2</sub>. Aquests anàlisis permetia calibrar diàriament la concentració de solvent de dins les cambres.

Durant l'exposició, també s'utilitzava un espectròmetre de masses (Omnistar GSD 320 O2) amb filament itri-iridi (Pfeiffer buit) per controlar l'estabilitat de la generació de vapor.

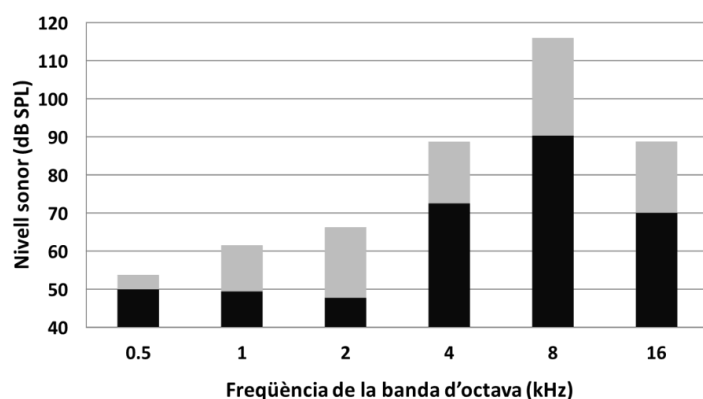
#### 4.3.2 Exposició al soroll

Dos altaveus van ser col·locats al sostre de les cambres d'exposició (Fig. M3B). Els animals es trobaven en cel·les separades per tal d'evitar la creació de pantalles acústiques naturals. El camp acústic de cada cel·la era bastant homogeni ( $\pm 1$  dB). A més, per minimitzar les diferències entre animals, es va anar rotant la posició de cada un d'ells diàriament. Dins les cambres, el soroll de fons era, principalment, un soroll de baixa freqüència (entre 63 Hz i 500 Hz) d'uns 50 dB. Per sobre de 500 Hz, el soroll de fons disminuïa a 30 dB.

Es van realitzar exposicions a diferents tipus de soroll (continu o impulsu) i a diferents freqüències (baixes freqüències, entre 0,5 i 2 kHz, o 8 kHz).

### 4.3.2.1 Soroll a 8 kHz

Per una banda, es van exposar els animals a un soroll amb un espectre centrat a 8 kHz, de manera impulsiva o contínua (Fig. M4).



**Figura M4.** Espectre del soroll centrat a 8 kHz. Àrea negra: soroll continu. Àrea grisa: soroll impulsiu.

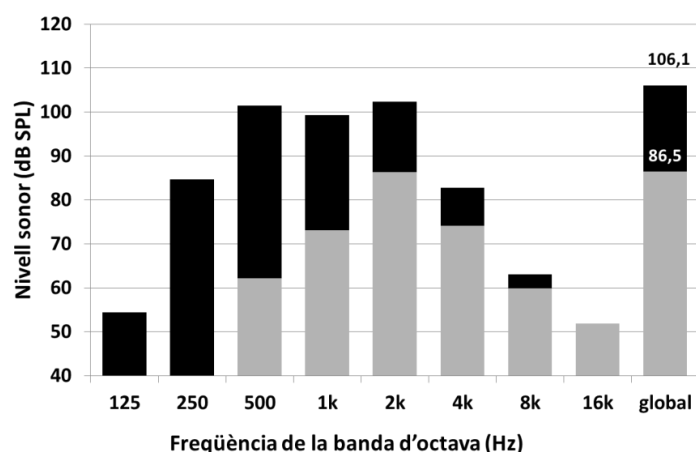
Les  $L_{EX, 8h}$  d'ambdós sorolls van ser elegits per tal d'obtenir una pèrdua auditiva equivalent al final del període d'exposició, d'aproximadament 5 dB. Es van fer servir dades d'experiments anteriors per determinar aquestes condicions (Venet et al., 2015).

La  $L_{EX, 8h}$  del soroll continu era 89 dB SPL (90,2 dB SPL durant 6 h). Pel que fa a l'exposició de manera impulsiva, cada pic de soroll dura uns 7 ms, separats per 15 s de soroll de fons. El material acústic col·locat dins de les cambres d'exposició es caracteritza per absorbir el so, la qual cosa permet un nivell de pressió sonor de 116 dB SPL que es manté durant 10 ms, seguit d'un ràpid descens, fent que el 90 % de l'energia acústica es dissipï en 10 ms. En aquestes condicions, la  $L_{EX, 8h}$ , calculada d'acord amb ISO 9612:2009, és 84 dB SPL.

Anteriorment, al nostre laboratori es va mesurar la latència del ROM per tal d'escollir els paràmetres adequats pel soroll impulsiu. Aquesta latència es va mesurar a través dels PDA, amb una alta resolució temporal (2 ms) després d'una estimulació acústica. La latència és el temps que transcorre entre el moment en que es produeix l'estímul sonor i l'inici de la disminució de les amplituds del PDA. Aquestes mesures es van repetir amb diferents freqüències primàries i diferents intensitats. Es va trobar que la latència mitjana necessària per activar el ROM era de 14 ms (de 11 a 17 ms). Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Pilz et al., 1997 i van den Berge et al., 1990. Com a resultat, els pics de soroll es completen abans de l'activació del ROM. A més a més, un període de 15 s entre dos estímuls sonors és suficient perquè els músculs de l'orella mitjana es relaxin. Cada soroll impulsiu és, per tant, totalment absorbit per la còclea, sense atenuació a causa del ROM.

### 4.3.2.2 Soroll ric en baixes freqüències

Es tracta d'una exposició continua durant 6 h a un soroll a 106 dB SPL. L'espectre del soroll es filtra a través de 3 bandes d'octava que van de 0,5 a 2 kHz, les quals corresponen a la freqüència amb la sensibilitat auditiva més baixa en rates (Fig. M5).

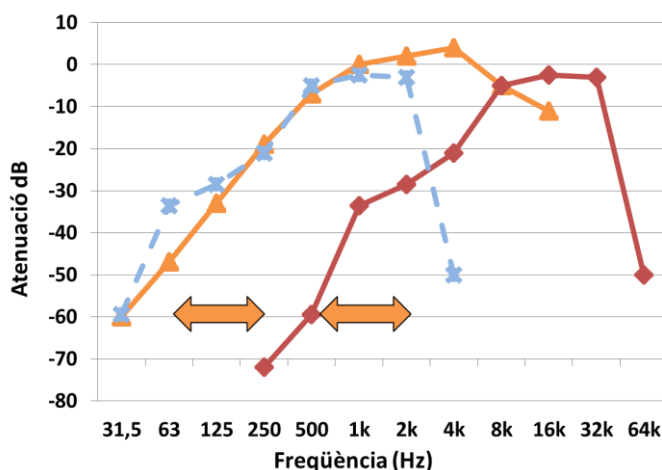


**Figura M5.** Espectre del soroll en baixes freqüències, centrat en tres bandes d'octaves (0,5 a 2 kHz) comparant el dB SPL i el dB de la rata. Àrea negra: dB SPL. Àrea grisa: dB rata. La intensitat del soroll continu és de 106,1 dB SPL que correspon a 86,5 dB rata.

La **intensitat del soroll** es va escollir per tal de que fos el més pròxim possible a la  $L_{EX,8h}$  en dB(A). Actualment, encara és impossible trobar en la literatura la comparació entre danys/efectes dels estímuls acústics (amplitud, espectre, durada) en les diferents espècies. Per aproximar-se a les condicions humanes, la nostra hipòtesi es va basar en el treball de DeCory et al., 1992, que conclou que les diferències en la susceptibilitat del soroll entre les espècies, inclòs els humans, coincideix bastant amb les diferències en la seva sensibilitat auditiva. En realitat, el llindar sonor es determina mitjançant la mesura de la potència acústica que es transmet des del camp lliure, l'aire, a l'orella interna (Rosowski, 1991). La transmissió de l'estímul acústic a l'orella interna sembla ser el responsable de la majoria de les diferències de sensibilitat auditiva entre espècies. Aquesta observació és molt important si es vol extrapolar als éssers humans les mesures de la pèrdua auditiva causada per exposicions al soroll realitzats en animals. Simplement, per a cada espècie, el patró de l'audiograma depèn principalment de la funció de transferència d'amplitud del sistema perifèric, en altres termes, de l'orella externa i mitjana. Quan es compara l'espectre de l'exposició al soroll amb una corba de ponderació en la rata, és possible estimar l'energia acústica que penetra a la còclea.



Es va escollir un soroll d'una **gamma de freqüència** entre 0,5 i 2 kHz perquè, com hem dit, si es mira la potència acústica de les rates trobem que no és igual que en els humans. Les rates tenen la capacitat de sentir els sons des de 250 Hz fins a 64 kHz, mentre que nosaltres percebem el soroll de 20 Hz a 16 kHz, per tant, podem dir que trobem un desplaçament de 4 octaves (Fig. M6). Les freqüències considerades com a “baixes freqüències” en els humans no són les mateixes que les “baixes freqüències” en les rates. El soroll entre 0,5 i 2 kHz per les rates es percep de manera similar als sorolls entre 63 i 250 Hz en els humans. Finalment, pel que fa a la **intensitat**, si es mira l'atenuació de les rates, veiem que es necessita molta energia per la percepció dels sons de baixes freqüències. Si prenem la ponderació A i la desplaçem quatre octaves obtenim la ponderació “rata” (dB rata). Així doncs, podem considerar que una exposició a 105 dB en sorolls rics en baixes freqüències a la rata equival a una exposició a 85 dB en humans (Fig. M6).



**Figura M6.** Comparació de la potència acústica entre els humans i les rates on es veu que les baixes freqüències en humans (63 a 250 Hz), correspon a 0,5 a 2 kHz a les rates. Línia vermella: mitjana rata. Línia taronja: potència acústica a 0 dB. Línia blava: mitjana rata desplaçada 4 octaves.

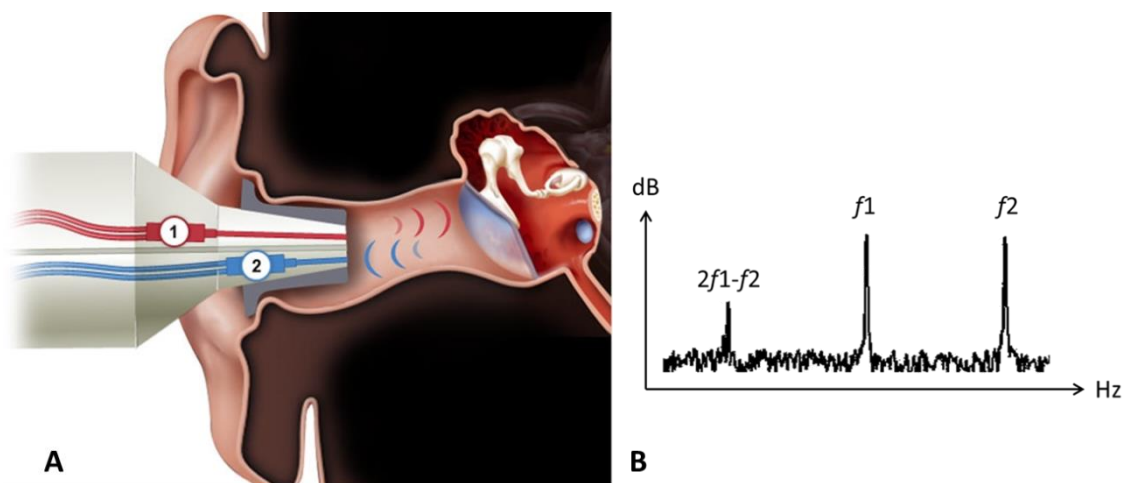
## 4.4 Mesures funcionals

Per tal d'avaluar el funcionament de la còclea i del vestibul, es va portar a terme les mesures dels **productes de distorsió acústics** i del **reflex vestibulo-ocular**, respectivament.

### 4.4.1 Productes de distorsió acústics

Els **productes de distorsió acústics (PDA, DPOAE en anglès)** són esdeveniments acústics que pertanyen a la família de les oto-emissions provocades. S'obtenen després de l'estimulació simultània i contínua de dos sons purs, anomenats primàries, de freqüències  $f_1$  i  $f_2$  tals que  $f_2 = 1,2f_1$ . El senyal acústic que es recull dins el conducte auditiu extern és el resultat de les distorsions creades pel sistema auditiu quan s'hi aplica aquests dos sons primaris (Fig. M7). A causa d'aquesta estimulació, varis PDA s'emeten de manera simultània, però el més utilitzat en clínica i recerca és el producte cúbic ( $2f_1 - f_2$ ), el qual és utilitzat en les nostres investigacions, ja que persisteix per intensitats relativament febles de les primàries, siguin quines siguin aquestes freqüències primàries. El PDA cúbic és un indicador específic de la funció i disfunció de les CCE (Avan et al., 2001).

Per tant, la mesura del PDA és un mètode objectiu per avaluar el mecanisme actiu de les CCE, és a dir, el funcionament correcte d'aquestes. És un mètode senzill i ràpid que avalua una de les funcions més fràgils de la còclea.



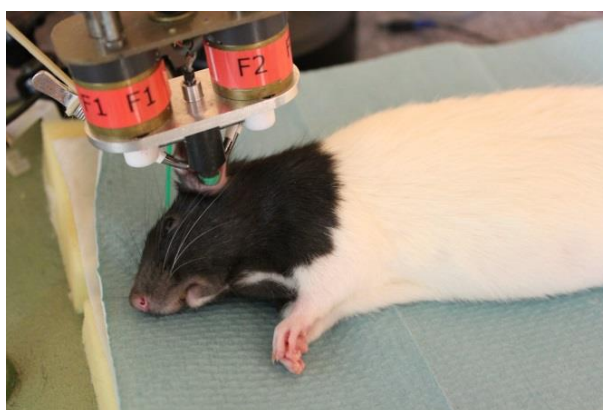
**Figura M7.** Productes de distorsió acústics. (A) La sonda es col·loca en el conducte auditiu extern i conté un altaveu (1) que emet el so estimulant i un micròfon (2) que recull el so emès per les cèl·lules ciliades externes. (B) Freqüències primàries emeses ( $f_1$  i  $f_2$ ) i el producte cúbic ( $2f_1 - f_2$ ) que emet la còclea i el qual és analitzat. Font: imatge adaptada de Voyage au centre de l'audition.

#### **4.4.1.1 Mesura dels productes de distorsió acústics**

Per mesurar els PDA a les rates és necessària una anestèsia general. L'anestèsia es va induir per injecció intraperitoneal (i.p) d'una barreja de Ketamina (Clorkétam®, 45 mg/kg) i Xylazina (Rompún®, 5 mg/kg). Es va realitzar un examen otoscòpic abans de portar a terme les mesures per assegurar l'absència d'infecció, d'obstrucció del conducte auditiu extern o d'anomalia de la membrana timpànica. La temperatura dels animals anestesiats es mantenia a 38°C mitjançant una manta elèctrica.

Totes les mesures es realitzaven dins una cabina insonoritzada. La sonda de mesura dels PDA, elaborada al nostre laboratori, combina dos traductors que generen les freqüències primàries f1 i f2 i un micròfon que mesura la pressió acústica dins el conducte auditiu extern (Shaffer et al., 2003; Venet et al., 2011). Aquests es combinen dins la sonda, l'extrem de la qual es posa a l'entrada del conducte auditiu extern de l'animal anestesiats de manera hermètica (Fig. M8).

Les senyals de les freqüències primàries són generades per un sintetitzador de freqüència (Pols B&K 3110) i emesos per dos micròfons en miniatura (B&K 4191). Les primàries f1 i f2 es generen simultàniament dins l'orella esquerra de l'animal en forma de senyals sinusoidals (sons purs) on les freqüències tenen una relació  $f2 = 1,2f1$  i les intensitats de les quals corresponen a  $L1-L2 = 14$  dB.

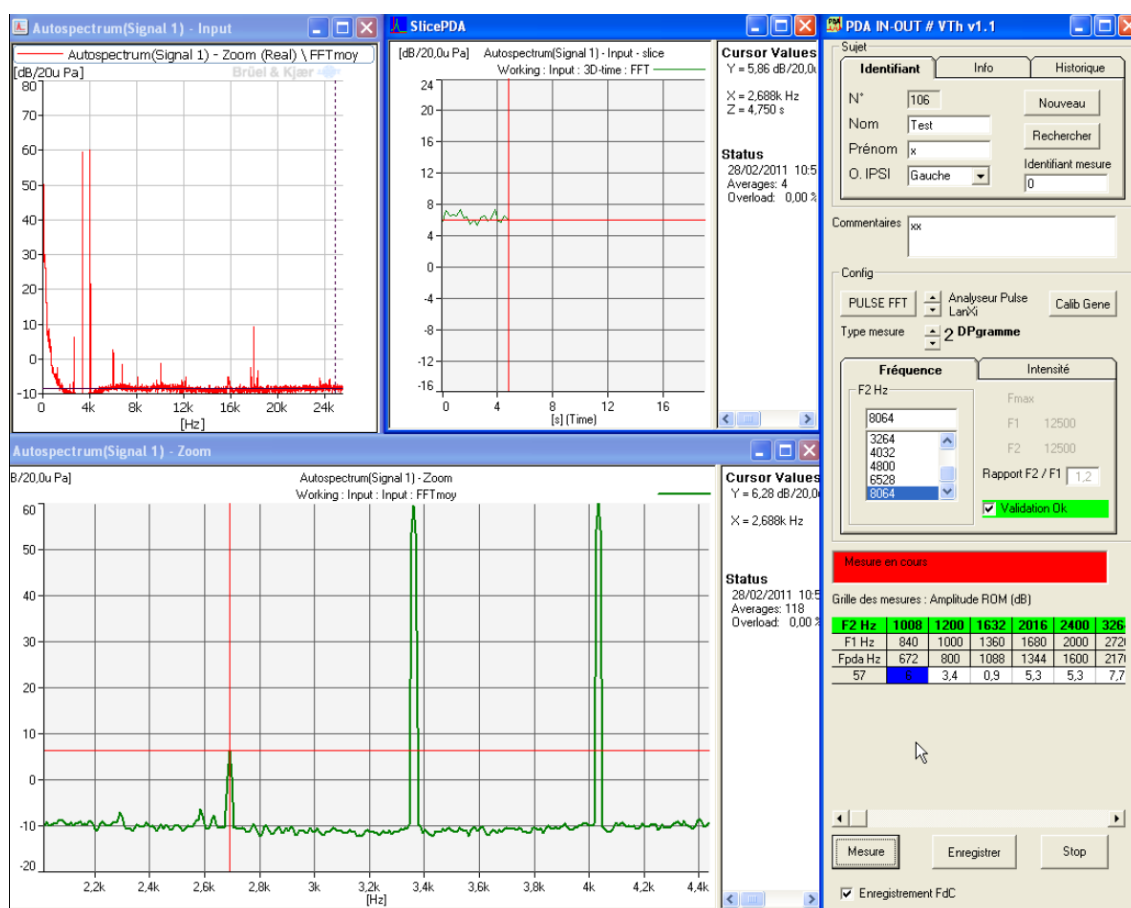


**Figura M8.** Posicionament de la sonda a un animal anestesiats per tal de mesurar els productes de distorsió acústics.

Un procediment de calibratge verificava la intensitat de les primàries. Aquest es realitzava a través d'un micròfon de polzada 1/8 (B&K tipus 4138) col·locat en una encaix específic.

La resposta acústica es mesurava a través del micròfon de mesura (Knowless FG 23329-C05) unit a un analitzador FFT (Fast Fourier Transform) (Pols B&K 3110). L'amplitud dels PDA es van determinar com la mitjana lineal dels espectres enregistrats durant 4 s (Fig. M9).

Sis parells de freqüències primàries (f1 - f2) van ser analitzats successivament: (3 – 3,6), (4 – 4,8), (5 - 6), (8 – 9,6), (14,6 – 17,5) i (21,2 – 25,4) kHz, amb una intensitat de la f1 de 60 dB. Per simplificar la presentació dels resultats, cada parell de primàries es representa per la f2. L'audició dels animals es va mesurar just abans de l'inici de l'exposició (PDA0) en acabar l'exposició (PDA1) i al final del període de recuperació (PDA2).



**Figura M9.** Programa que permet l'anàlisi i l'enregistrament dels productes de distorsió cúbics en una rata.

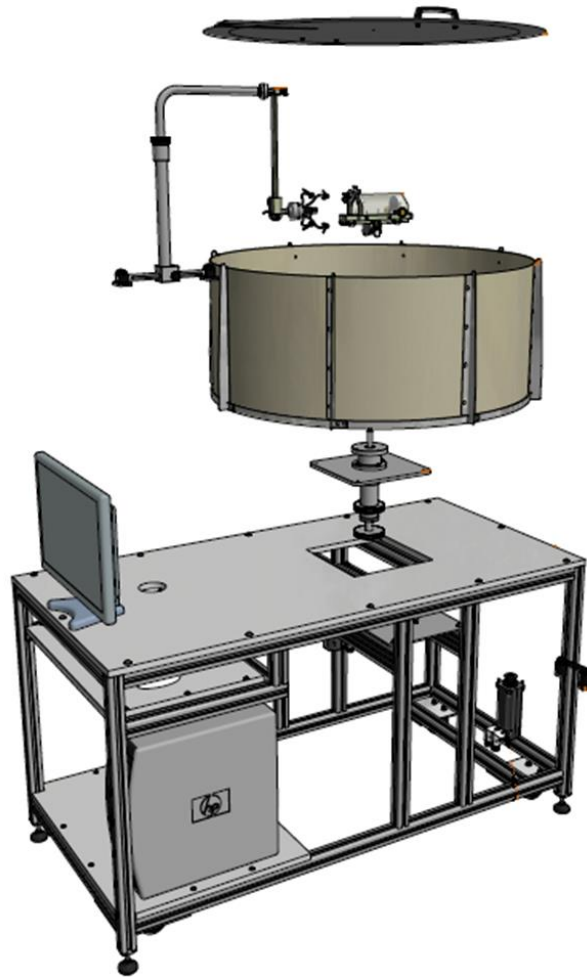
#### 4.4.2 Reflex vestibulo-ocular

El nistagme pot utilitzar-se com a indicador de la integritat del sistema vestibular i és una mesura objectiva per identificar perturbacions temporals i/o permanents del sistema vestibular a nivell perifèric o central (Gabersek et al., 1963). La mesura del RVO s'ha utilitzat com a model per avaluar la funció vestibular en diverses espècies. L'ús de RVO per avaluar trastorns de l'equilibri deguts a una exposició a un solvent es va utilitzar per primer cop en toxicologia per Odkvist et al., 1979, els quals van observar una alteració del RVO tant en conill com en humans després d'exposicions a solvents. Una dècada després, Niklasson et al., 1993 i Nylén et al., 1991 van utilitzar la mateixa tècnica per avaluar l'equilibri en rates. Per tant, es fa evident que l'efecte d'un solvent sobre l'equilibri es pot avaluar mitjançant mesures del RVO.

Després d'una lesió vestibular, aquest reflex pot trobar-se reduït, però, gràcies a la seva plasticitat neural, pot retornar a les condicions normals després de pocs dies o setmanes (Courjon et al., 1977; Paige 1983b).

Els anàlisis del **NPR** detecten trastorns cerebrals i del cerebel (Angelaki et al., 1995, 1996; Wennmo et al., 1981). A més, la mesura del NPR també es va utilitzar per estudiar els efectes dels metalls en sobre l'equilibri (Mameli et al., 2001, 2006).

Un sistema d'avaluació i enregistrament del **NPR** es va desenvolupar al nostre laboratori (INRS, França) per tal d'obtenir les mesures en rates adultes en vigília (Fig. M10 i M11D).



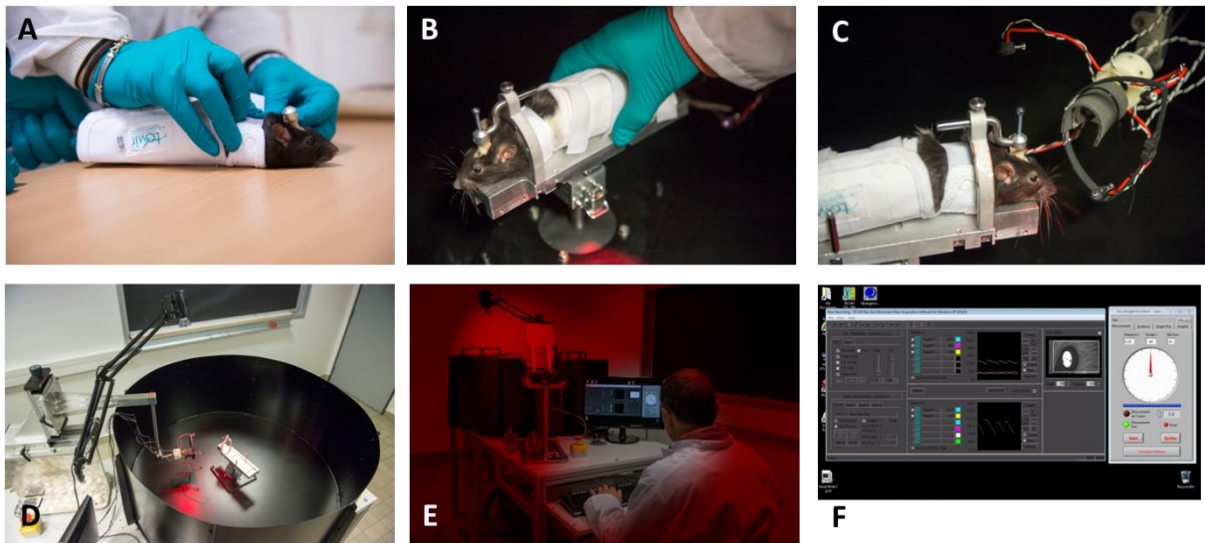
**Figura M10.** Pla del banc de nistagme dissenyat per l'INRS.  
Font: INRS.

#### 4.4.2.1 Cirurgia

La cirurgia es porta a terme unes tres setmanes abans de la primera mesura del nistagme. Es fa una incisió a la pell d'uns 1,5 cm de llargada sobre el crani (entre les orelles i els ulls), en condicions estèrils. Es neteja el teixit conjuntiu i es rasca i desvitalitza amb nitrat de plata. S'escampa sobre el crani sec una fina capa de cola de cianoacrilat abans adherir, mitjançant ciment dental (Taab 2000®), una rosca de caragol (Simaf, 40C030H065) que formi un angle de 30°C respecte el pla de la mirada,. Les rates són aïllades durant el període de recuperació d'una setmana i vigilades atentament durant un parell de setmanes.

#### 4.4.2.2 Període d'habitució

Una setmana després de la cirurgia, els animals van començar un període d'habitució per acostumar-los a romandre quiets durant l'enregistrament del NPR. En primer lloc, van passar uns dies per habitar-se al experimentador. Després, els van immobilitzar dins una camisa suau resistent “*Small Animal Snuggle Restraint Devices*” (Harvard apparatus, 72-6267) (Fig. M11A). El darrer pas era la immobilització del cap. Aquesta habituació es va portar a terme durant més d'una setmana, i és clau pel correcte i adequat enregistrament del NPR.



**Figura M11.** Mesura del nistagme post-rotatori a la rata. (A) Posicionament de la rata dins la camisa de retenció. (B) Posicionament i fixació de la rata sobre el suport rotatori. (C) Posicionament de l'ull de la rata al centre de la càmera. (D) Imatge general del banc de nistagme. (E) Mesura del nistagme en l'obscuritat. (F) Imatge de la pantalla de l'ordinador quan s'està enregistrant el moviment de l'ull una vegada la rotació ha acabat. Font: INRS.

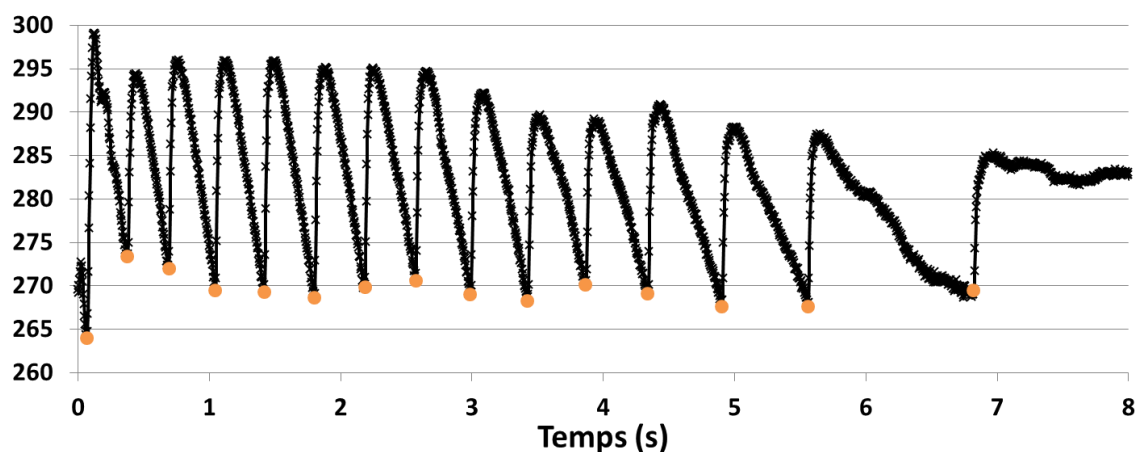
#### 4.4.2.3 Mesura del nistagme post-rotatori

Les mesures del NPR es van portar a terme a les fosques (Fig. M11E). Per estabilitzar el cap de l'animal durant la rotació, aquest es va bloquejar amb un caragol fixat en una barra de metall al centre del suport rotatori (Fig. M11B). El cap es trobava en un angle de  $30^\circ$  respecte el pla de la mirada, la qual cosa correspon amb l'angle que forma el canal semicircular lateral en el pla horitzontal. L'animal es va posicionar amb la càmera centrada sobre l'ull esquerre (Fig. M11C). El suport girava de manera completa, és a dir,  $360^\circ$ , amb una acceleració i desacceleració màxima idèntica, de  $870^\circ/\text{s}^2$ . L'estimulació rotacional tenia una durada de 40 s i, per cada animal, es va realitzar dues estimulacions a dues velocitats diferents:  $90^\circ/\text{s}$  i  $360^\circ/\text{s}$ , amb un minut de repòs entre ambdues.



Els moviments horitzontals del l'ull va ser enregistrats utilitzant el sistema “*RK-826PCI Eye Tracking System*” (ETL-200 ISCAN, Inc. 21 Cabot Road Woburn, MA 01801 USA), un sistema d'enregistrament amb una càmera infraroja d'alta resolució, que capta 240 imatges cada segon (Fig. M11F).

Es van analitzar diferents paràmetres del NPR: nombre de sacades, durada total de les sacades i pendent d'amortiment de les sacades (Fig. M12). El funcionament del sistema vestibular dels animals es va mesurar just abans de l'inici de l'exposició (NPR0) en acabar l'exposició (NPR1) i al final del període de recuperació (NPR2).



**Figura M12.** Exemple d'una mesura del nistagme post-rotatori, després d'una estimulació a 90°/s on es pot veure el nombre de sacades (punts taronges) i el temps total del moviment de l'ull (eix x).

## 4.5 Mesures del comportament

Qualsevol canvi causat per un agent neurotòxic en alguna de les funcions sensorials, motores, sensori-motors o cognitives de l'individu afecta la seva relació amb l'entorn. Aquesta relació, que revela el funcionament integrat del sistema nerviós pot ser avaluada mitjançant tests del comportament (Tilson and Mitchell, 1984). En neurotoxicologia humana, el comportament es pot avaluar mitjançant la informació subjectiva relatada per l'individu. En canvi, en els estudis amb animals, el disseny dels tests comportamentals és molt més complex. Treballs previs han desenvolupat **tècniques comportamentals** per avaluar el nivell de **degeneració vestibular de la rata** (Llorens and Rodríguez-Farré, 1997). Aquestes tècniques consisteixen en una bateria de tests que avaluen el comportament espontani i reflex, que conjuntament donen com a resultat una bona indicació de l'estat funcional del vestibul de la rata (Balbuena and Llorens, 2001, 2003; Boadas-Vaello et al., 2005; Desmadryl et al., 2012).

En el nostre projecte, es va estudiar la disfunció vestibular a través 4 tests de comportament diferents. Per tal d'avaluar de manera quantitativa aquests tests, es van enregistrar els moviments de l'animal a través de dues càmeres GoPro (Hero4 black) situades davant, al costat o darrere de la taula de vidre on es portaven a terme els tests. Finalment, es van analitzar les imatges a través del programa Kinovea®, un software d'anàlisi de vídeo el qual permet centrar-se en una acció específica i estudiar la estructura del moviment fotograma per fotograma o en càmera lenta. Aquests tests es van fer abans de començar l'exposició, en acabar les 4 setmanes d'exposició i 4 setmanes després del període de recuperació.

### 4.5.1 Avaluació del reflex d'aterratge (*Tail-lift reflex*)

Quan una rata és aixecada per la cua, estén les potes del davant de forma espontània per tal de preparar-se per a un possible aterratge (reflex d'aterratge). Les rates que presenten un dèficit vestibular, es corben sobre elles mateixes en direcció ventral (Hunt et al., 1987; Llorens et al., 1993b).



Per analitzar les diferències entre els animals, es va mesurar l'angle que formava el cos quan l'animal es trobava suspès per la cua (Fig. M13).



**Figura M13.** Avaluació del reflex d'aterratge. Rata control sense alteració del reflex d'aterratge.

#### **4.5.2 Avaluació del reflex d'incorporació en l'aire (*Air-right reflex*)**

Per avaluar el reflex d'incorporació en l'aire, les rates es mantenen sospeses amb la mà en posició decúbit supí a uns 40 cm d'una superfície tova i es deixaven caure. Les rates controls es giren ràpidament per tal de caure sobre les quatre potes, mentre que les vestibulo-deficients ho fan més lentament o no ho fan (Ossenkopp et al., 1990).

Es va mesurar el temps que tardava l'animal en retornar completament el seu cap i/o el seu cos (Fig. M14).



**Figura M14.** Avaluació del reflex d'incorporació en l'aire. Rata control sense alteració del reflex d'incorporació.

### 4.5.3 Avaluació de la superfície de sustentació

Es va mesurar la superfície del quadrilàter que formen les quatre potes de la rata abans de començar la marxa (Fig. M15) (Tighilet et al., 2015). Quan major és la superfície, major és el dany vestibular.



**Figura M15.** Avaluació de la superfície de sustentació d'una rata control.

### 4.5.4 Locotronic®

El Locotronic® (Intellibio innovation) és un aparell que mesura els errors de marxa i, per tant, l'equilibri dels animals (Fig. M16). S'utilitza com a test pels danys sensorials i/o motors. Es tracta de fer avançar l'animal al llarg del passadís, amb un inici i un final establert, format per barres separades per 3 cm entre elles, amb detectors infrarojos que permeten d'enregistrar el desplaçament de l'animal, així com els errors durant la marxa. Un software recull la informació dels sensors i els diferencia en errors de les potes de davant, de les potes de darrera o de la cua.



**Figura M16.** Aparell Locotronic®. Font: imatge de <http://www.intelli-bio.com>

## **4.6 Tècniques quimicoanalítiques**

### **4.6.1 Concentració de CS<sub>2</sub> en la sang**

Després de l'absorció del CS<sub>2</sub>, aquest es transporta a través de la sang per distribuir-se als diferents òrgans i teixits. Per tal de determinar l'impacte del solvent sobre l'animal, es va mesurar la concentració de CS<sub>2</sub> total sanguínia just al final de les 4 setmanes d'exposició.

#### **4.6.1.1 Extracció de sang venosa**

Al final del darrer dia d'exposició, mentre les concentracions atmosfèriques es mantenen constants en cambres d'inhalació, les rates es van anar retirant d'una en una. Els animals van ser anestesiats amb gas isoflurà (5 % per induir l'anestèsia i es va mantenir a 3 % durant l'extracció) utilitzant un vaporitzador Isotec 4 (Ohmeda) i un generador de O<sub>2</sub> Millennium 5 Concentrator (Respironics). La cua de la rata es va escalfar dins aigua a 40°C per tal de dilatar els vasos sanguinis. Amb l'ajuda d'un catèter venós tipus Surflo®, es va extreure al voltant de 0,8 mL de la vena caudal lateral de l'animal, i es va disposar dins tubs de vidre amb heparina (30 µL). Les mostres van ser conservades a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

#### **4.6.1.2 Anàlisi de la concentració de CS<sub>2</sub>**

Per tal d'alliberar el CS<sub>2</sub> unit, les mostres de sang van ser acidificades amb 250 µL de HCl 2 % i es van agitar durant 10 min després de l'addició de 10 µL de solució estàndard (1,5 g/L MEK en DCM) (Lam and DiStefano, 1986). Les mostres van ser extretes amb 500 µL de DCM i, després d'una agitació de 30 min i una centrifugació de 20 min a 3220 g a -4 °C, la capa de DCM es va analitzar. La linealitat es va demostrar entre el límit de quantificació (0,3 µg) i 15 g de CS<sub>2</sub>; el límit de detecció va ser de prop de 0,1 µg, l'exactitud estava sota del -12,4 % i la precisió era propera al 15 %.

## 4.6.2 Concentració de TTCA en l'orina

La reacció del CS<sub>2</sub> amb cisteïna o glutatona genera tritiocarbamats, que es poden ciclar per formar el TTCA. Aquesta reacció la porta a terme devers un 5 % del CS<sub>2</sub> absorbit. Ara bé, aquest compost esdevé un bon indicador biològic i s'utilitza per l'avaluació de les exposicions al CS<sub>2</sub> ja que, dies després de l'exposició, encara es troben nivells detectables de TTCA (Graham et al., 1995; Roh et al., 1999).

El metabolisme del CS<sub>2</sub> s'avalua mitjançant la recol·lecció de l'orina dels animals que van ser col·locats en gàbies de metabolisme a la sortida de l'exposició.

### 4.6.2.1 Recull d'orines

Després del darrer dia d'exposició, les rates van romandre 18 h en gàbies de metabolisme individuals (220 x 220 x 180 mm). Els animals van tenir accés a menjar i aigua. Un sistema de refrigeració va mantenir l'orina a 4°C. L'endemà, per a cada mostra, es va fer un test ràpid a partir d'una tira reactiva d'orina (Combur<sup>9</sup> Test 04510038 191, Roche) per anotar el pH i l'absència de sang i nitrats. Les mostres es van guardar a -20°C fins el moment de l'anàlisi.

### 4.6.2.2 Anàlisi de la concentració de TTCA

La concentració de TTCA en l'orina es va determinar fent servir una cromatografia d'alta eficàcia amb una columna automatitzada de commutació (Simon and Nicot, 1993). Breument, l'orina diluïda es va purificar en una columna d'intercanvi aniònic, i, després de la transferència de la fracció d'interès, l'anàlisi es va portar a terme de manera isocràtica en una columna cianoamino combinada amb detecció de llum ultraviolada a 275 nm.

En aquestes condicions, la linealitat es va demostrar entre el límit de quantificació (0,15 mg/L) i 50 mg/L de TTCA; el límit de detecció era inferior a 0,05 mg/L, la recuperació va ser major que 95 % i les precisions van ser superiors al 99 %.

### **4.6.3 Concentració de CS<sub>2</sub> al cervell**

A causa de la seva naturalesa lipòfila, la distribució del CS<sub>2</sub> és major en teixits rics en lípids com el cervell i el fetge, on és metabolitzat (Hoar et al., 1985).

Es va mesurar la concentració de CS<sub>2</sub> total al cervell en sortir de l'exposició.

#### **4.6.3.1 Dissecció del cervell**

Els animals es van anestesiar profundament amb una barreja de Ketamina (Clorkétam®, 75 mg/kg) i Xilacina (Rompún®, 5 mg/kg) via i.p i es van decapitar per realitzar l'extracció del cervell. Les mostres es van submergir en nitrogen líquid per una ràpida congelació i es van conservar a -80°C fins el moment de l'anàlisi.

#### **4.6.3.2 Anàlisi de la concentració de CS<sub>2</sub>**

El cervell es va descongelar i es va agafar una tercera part de la seva massa total ja que hi ha el material suficient per tal d'analitzar la concentració de solvent. El terç de l'òrgan es va posar dins un tub FastPrep Lysing Matrix de 2mL. Es van addicionar 500 µL de DCM i 10 µL de la solució estàndard MEK. Es va triturar el teixit amb el FastPrep®-24 Classic Instrument durant 20 s, a 4 m/s. Finalment, es va centrifugar durant 20 min a 4.000 g a -4°C.

L'anàlisi de les mostres es va fer per detecció de masses per cromatografia de fase gasosa: GCMS QP 2010 Ultra (Shimadzu) amb una columna Rtx 1701 (30 m × 0,25 mm × 1 µm). La linealitat es va ser validada entre 0,15 µg i 15 µg de CS<sub>2</sub>; el límit de detecció era 0,014 µg de CS<sub>2</sub>, i el límit de quantificació de més o menys 0,047 µg de CS<sub>2</sub>, el rendiment mitjà d'extracció va ser de 98,2 % (± 8,5), i la repetibilitat mitjana de 3,5 % (± 2,0).

## 4.7 Tècniques histològiques

Per tal d'analitzar si existien lesions perifèriques en el sistema vestibular i el sistema auditiu, els epitelis sensorials d'ambdós sistemes es van observar mitjançant diferents tècniques.

Per portar a terme els estudis histològics, els animals es van anestesiar profundament amb una barreja de Ketamina (Clorkétam®, 75 mg/kg) i Xilacina (Rompún®, 5 mg/kg) via i.p i es van decapitar per realitzar la dissecció dels òrgans necessaris.

### 4.7.1 Microscòpia òptica

Les còclees, els epitelis vestibulars i els ganglis, tant el gangli espiral com el gangli de Scarpa, van ser fixats i inclosos dins una resina per tal de realitzar talls semi-fins i observar, a través del microscopi òptic, l'estat de les estructures corresponents i si trobem excitotoxicitat, tant a la sortida de l'exposició com al final del període de recuperació.

Igualment, després del període de recuperació, es va fer un recompte de les cèl·lules ciliades de l'òrgan de Corti amb la finalitat de realitzar l'anomenat "cocleograma".

Tots els talls i mostres es van observar al microscopi òptic Olympus BX41. Una càmera (Baumer TXD14c) i un ordinador equipat amb el programa Archimed es troben connectats al microscopi amb la finalitat de realitzar fotografies.

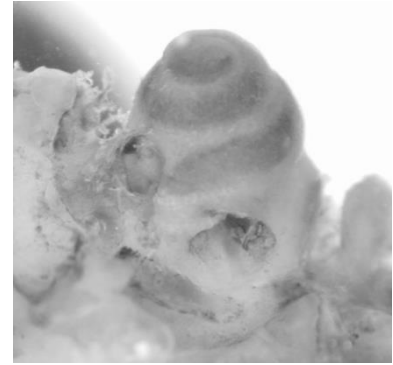
#### 4.7.1.1 Inclusió de la còclea (òrgan de Corti i gangli espiral)

La còclea es va extreure ràpidament per ser perfosa a través de les dues finestres amb una solució de glutaraldehid 2,5 % dins tampó cacodilat 0,2 M a pH 7,2. Aquestes van romandre dins aquest fixador durant 15 dies a 4°C. Seguidament, es van netejar amb el tampó cacodilat 0,2 M i es van post-fixar durant una hora amb una solució de tetròxid d'osmi (1 % OsO<sub>4</sub> dins cacodilat 0,2 M) abans de netejar-se de nou amb el tampó. Les còclees es van fresar dins etanol 70° per reduir la part òssia, deixant una fina capa transparent (Fig. M17).



Les còclees es van deixar dins una solució d'EDTA 10 % amb etanol 70° durant tota la nit (ON: over night) per descalcificar-les.

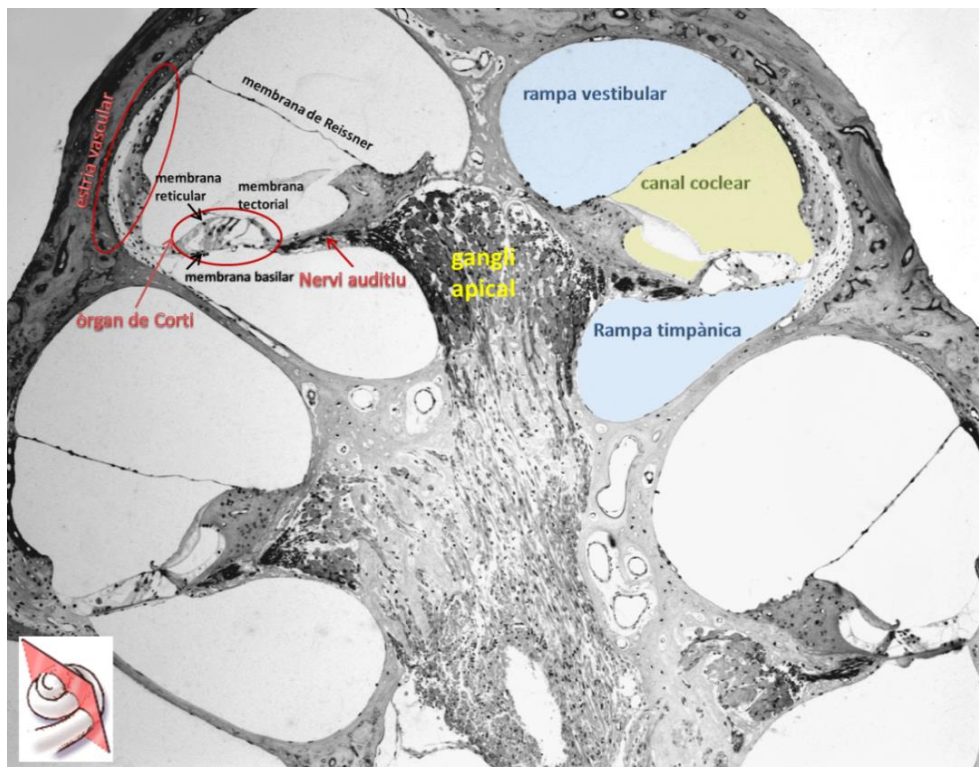
Seguidament, es va procedir a la realització del protocol de deshidratació i inclusió. Primer, es van deshidratar dins banys d'etanol de concentracions creixents (70, 80, 90 i 100° ON). L'endemà, es va portar a terme la impregnació en resina EPON (Epoxy embedding medium) (DDSA 55,8 %, EPON



**Figura M17.** Imatge d'una còclea fresada.

25,3 %, araldite 15,2 %, ftalat de dibutil 2 % i 2,4,6-trimetilaminoetil fenol 1,7 %), primer dins 50/50 òxid de propilè/resina EPON durant 1 h, després 25/75 òxid de propilè/resina EPON durant 1 h i finalment, la inclusió dins 100% resina EPON ON. Per acabar, les còclees es van posicionar i orientar dins motlles amb resina EPON i es van incubar a 30°C durant 15 h, seguit de 24 h a 60°C.

Els blocs de resina polimeritzada es van tallar i piramidar paral·lelament a l'eix del *modiolus* de la còclea a l'ultratrium (Leica), fins veure el nervi auditiu al centre del tall. Finalment, es van realitzar seccions semi-fines transversals de 2,5 µm amb el micròtom (Microm HM355S, LEICA) (Fig. M18). Es van tenyir els talls amb violeta de cresil (200 mg dins 40 mL d'aigua destil·lada) i es van observar al microscopi òptic.



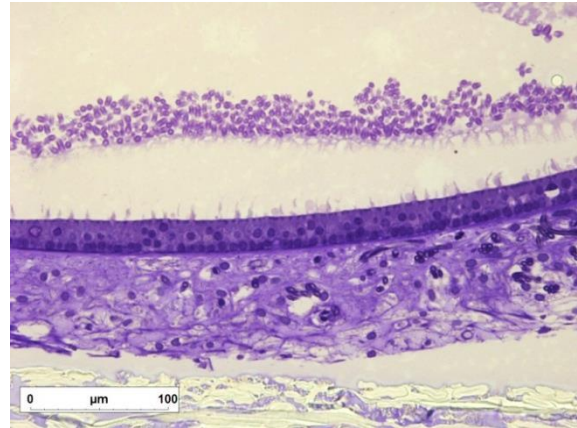
**Figura M18.** Imatge d'un tall semi-fi transversal de 2,5 µm on es poden apreciar totes les estructures anatòmiques de la còclea. Font: INRS.

#### 4.7.1.2 Inclusió de l'epiteli vestibular (utricle, sàcul i crestes)

L'os temporal es va obrir ràpidament amb una pinça per tal de deixar entrar immediatament dins el vestíbul una solució de glutaraldehyd 2,5 % dins cacodilat de sodi 0,2 M. Després d'una setmana de fixació a 4°C, es va realitzar la dissecció de l'epiteli vestibular (crestes, utricle i sàcul) amb la lupa binocular i es van treure les membranes que recobreixen els epitelis sensorials.

Els teixits es van netejar amb cacodilat 0,2 M a un pH de 7,2, es van post-fixar amb tetròxid d'osmi 1 % dins tampó cacodilat durant 1 h, es van tornar a netejar amb cacodilat 0,2 M, i es van deixar dins alcohol 70°.

Les mostres van ser incloses dins la resina EPON seguint el mateix protocol que per la còclea. Finalment es van tallar de manera transversal els epitelis, es van colorar i es van observar al mateix microscopi (Fig. M19).



**Figura M19.** Imatge d'un tall semi-fi transversal de 2,5 µm d'un utricle d'una rata control.

#### 4.7.1.3 Inclusió del gangli de Scarpa

Es va tallar el crani per la meitat, de manera longitudinal, amb la finalitat de submergir el conjunt de l'orella interna + os temporal + cervell dins una solució de glutaraldehyd 2,5 % dins cacodilat de sodi 0,2 M. Després de 15 dies de fixació a 4°C, els ganglis de Scarpa es van dissecar amb la lupa binocular.

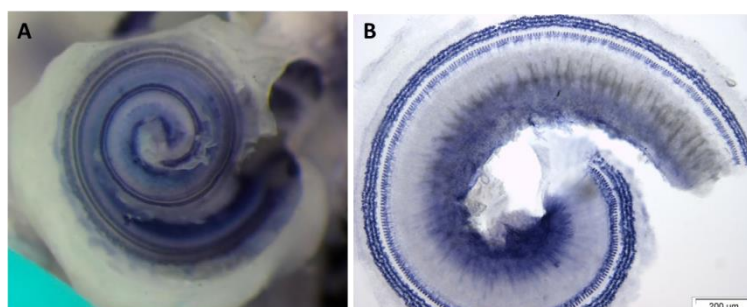
Les mostres es van netejar dins el tampó cacodilat 0,2 M, es van post-fixar amb tetròxid d'osmi 1 % durant 1 h i de nou netejats i conservats dins etanol 70° a 4°C.

Les mostres es van incloure dins resina EPON seguint el mateix protocol que les inclusions de la còclea i els epitelis vestibulars. Es van tallar al micròtom en talls de 2,5 µm i colorar amb violeta de cresil abans de ser observats al microscopi òptic.



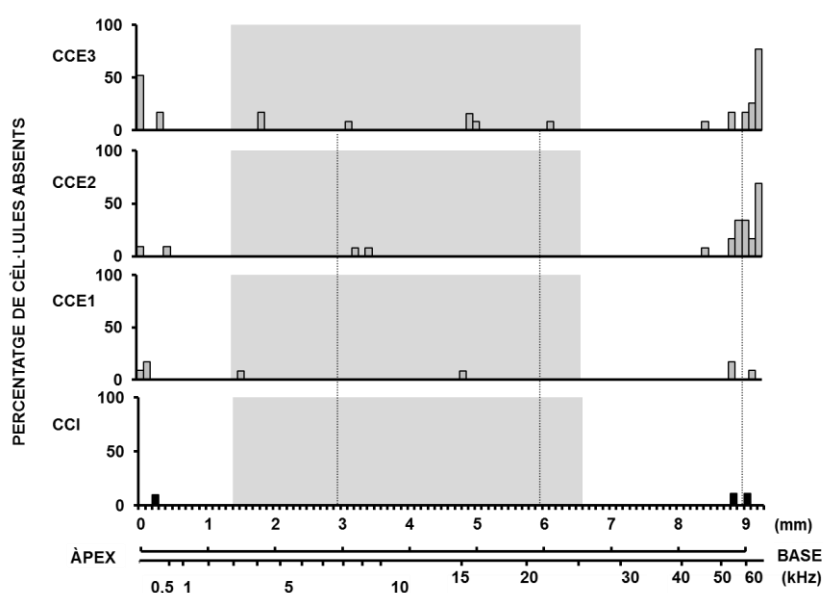
#### 4.7.1.4 Cocleograma

Les còclees van ser ràpidament retirades i perfoses a través de la finestra rodona i oval amb una solució SDH (0,05 M de succinat de sodi, 0,05 M tampó fosfat i 0,05 % de nitroblau de tetrazolium). Les còclees es van submergir dins aquesta solució i es van deixar al bany maria a 37°C durant 1 h abans de ser fixades amb una solució de paraformaldehid 4 % durant 24 h. Les còclees es van fresar i dissecar dins tampó fosfat salí (PBS: *phosphate buffered saline*). Amb la lupa binocular, la làmina espiral òssia, el lligament espiral i les membranes tectorial i de Reissner van ser retirades per tal de deixar visible l'òrgan de Corti (Fig. M20). Aquest òrgan es va dividir en tres fragments corresponents a les tres voltes; apical, mitjana i basal, i es va muntar damunt un porta làmina amb una gota de glicerina.



**Figura M20.** (A) imatge d'una còclea marcada amb la solució SDH i dissecada. (B) Imatge de la volta apical.

El cocleograma és un gràfic on es plasma el percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades de les tres files de CCE i la fila de CCI, al llarg de tota la còclea, relacionant la longitud d'aquesta amb la freqüència (relació distància / freqüència) (Fig. M21). Es va realitzar el cocleograma de cada animal fent un recompte de les cèl·lules ciliades presents (rodons blaus) amb el



**Figura M21.** Exemple d'un cocleograma d'una rata control on es representa el percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades de cada fila (eix Y) i la distància (mm) al llarg de l'òrgan de Corti i el mapa de freqüències (eix X). L'àrea grisa representa el rang de freqüències que s'analitzen durant les mesures dels productes de distorsió acústics.

microscopi òptic (objectiu 40X), des de l'àpex a la base de l'òrgan de Corti. Es va utilitzar la carta en freqüències de la còclea (Müller, 1991) associada a un programa informàtic, desenvolupat al laboratori, per tal de determinar la posició de les pèrdues cel·lulars al llarg de l'òrgan.

## 4.7.2 Immunohistoquímica i microscòpia de fluorescència confocal

Al final de l'exposició i de les 4 setmanes de recuperació, es va portar a terme una immunohistoquímica (IHQ). Les còclees i els vestibuls van ser recollits, fixats i marcats amb anticossos fluorescents anti-NF200 (NF200 anticòs monoclonal clon N52, SIGMA, N0142) i anti-miosinaVIIa (Miosina VIIa policlonal de conill, Proteus Biosciences, 25-6790) per tal d'avaluar la possibilitat que hi hagués un dany a les fibres aferents i una pèrdua cel·lular.

Els neurofilaments estan compostos per 3 proteïnes neuronals específiques amb diferents masses moleculars. L'anticòs anti-NF200 reconeix la subunitat pesada dels neurofilaments (~180-220 kDa), tant en forma fosforilada com no fosforilada.

Les miosines són proteïnes motores amb base d'actina dependents d'ATP. Algunes miosines intervenen en els moviments intracel·lulars. Concretament, la miosina VIIa està relacionada amb la motilitat dels cilis i l'adhesió cel·lular. En l'orella interna aquesta proteïna pot mantenir la rigidesa dels estereocilis durant els moviments dinàmics. Un dèficit o una mutació d'aquesta pot traduir-se en pèrdua auditiva i disfunció vestibular.

Les mostres es van observar al microscopi confocal Leica TCS-SL de la Unitat de Microscòpia Òptica Avançada dels CCiTUB del Campus de Bellvitge utilitzant sempre les mateixes condicions per a les observacions i adquisicions de les imatges. Per les observacions de les còclees: objectiu = 40X o 63X, zoom = 2, series = 40 µm i seccions = 1 µm. Per les observacions dels epitelis vestibulars: objectiu = 40X o 63X, zoom = 2, series = 30 µm i seccions = 0,5 µm. Els settings (ajustos) dels diferents làsers d'excitació, 488 i 555, es van establir amb les mostres control i es van mantenir per les mostres tractades i en recuperació, per tal de tenir valors de fluorescència comparables.

### 4.7.2.1 Immunohistoquímica de la còclea

Les rates anestesiades van ser perfoses via intracardíaca amb sèrum fisiològic i heparina (1 %), seguit de 300 mL de paraformaldehid a 4 % dins PBS. Seguidament, es van extreure les còclees, es van post-fixar per perfusió intra-laberíntica amb el mateix fixador i es van deixar dins aquest durant 24 h a 4°C.

La còclea es va netejar dues vegades amb PBS a pH 7,2 durant 20 min a temperatura ambient (TA). Tot seguit es van submergir en solució crioprotectora (34,5 % glicerol, 30 % etilenglicol, 20 % PBS i 15,5 % aigua destil·lada) i es van deixar temperar. Seguidament, es van guardar a -20°C fins que es van dissecar.

Amb la lupa binocular, es van fressar i dissecar les còclees dins PBS. La làmina espiral òssia, el lligament espiral i les membranes van ser retirades, i l'òrgan de Corti es va dividir en tres fragments corresponents a les tres voltes; apical, mitjana i basal. Les mostres es van netejar dins PBS i es van tornar a guardar a -20°C dins la solució crioprotectora.

Per portar a terme la IHQ, els teixits fixats es van preincubar en una solució de blocatge (0,2 % Tritó<sup>TM</sup> X-100 i 5 % sèrum d'ase en PBS) durant 2 h a TA en agitació lenta. Les mostres es van incubar amb els anticossos primaris: MyoVIIa (1:200) + NF200 (1:400) en PBS ON a 4°C en agitació lenta. Es van rentar les mostres tres vegades amb PBS que contenia 0,2 % Tritó<sup>TM</sup> X-100 en agitació lenta a TA i es van incubar amb els anticossos secundaris Alexa-488 anti-rabbit IgG d'ase + Alexa-555 anti-mouse IgG d'ase (1:500) (Fisher Bioblock Science, Invitrogen<sup>TM</sup>, A21206 i A31570, respectivament) dins 0,2 % Tritó<sup>TM</sup> X-100 en PBS dues vegades a TA durant 90 min en agitació lenta. Es van fer quatre rentats de 10 min amb PBS en agitació lenta a TA i es van muntar amb Antifade®.

#### **4.7.2.2 Immunohistoquímica de l'epiteli vestibular**

Després del sacrifici, l'os temporal de les rates es va obrir amb una pinça per tal de deixar entrar dins el vestíbul, de manera immediata, una solució de paraformaldehid 4 % dins PBS. Es van fixar ON a 4°C, es va procedir a la dissecció de l'aparell vestibular (crestes, utricle i sàcul) per lupa binocular i es van treure les membranes que recobreixen els epitelis sensorials, per tal que hi hagués una correcta permeabilització dels anticossos.

Seguidament, els epitelis sensorials es van post-fixar amb paraformaldehid 4 % durant 1h a TA i es van netejar dues vegades amb PBS a pH 7,2 durant 20 min a TA. Tot seguit es van submergir en la solució crioprotectora, es van deixar temperar i es van guardar a -20°C fins el dia de la seva utilització. Abans d'utilitzar els epitelis es van realitzar dos rentats de 20 min amb PBS.

Per portar a terme la IHQ dels epitelis sencers, primer, es van preincubar els epitelis fixats durant 90 min a TA i en agitació lenta amb 4 % Tritó™ X-100 i 20 % sèrum d'ase en PBS. Les mostres es van incubar amb els anticossos primaris: MyoVIIa (1:500) + NF200 (1:800) dins 0,1 % Tritó™ X-100 i 1 % de sèrum d'ase en PBS durant 48 h a 4°C en agitació lenta. Es van fer quatre rentats de 10 min cadascun amb PBS en agitació lenta a TA i es van incubar les mostres amb els anticossos secundaris Alexa-488 anti-rabbit IgG d'ase + Alexa-555 anti-mouse IgG d'ase (1:500) (Fisher Bioblock Science, Invitrogen™, A21206 i A31570, respectivament) juntament amb 0,1 % Tritó™ X-100 en PBS ON a 4°C en agitació lenta.

Es van fer quatre rentats de 10 min amb PBS en agitació lenta a TA i es van incloure les mostres en gelatina líquida (0,49 % gelatina, 30 % albúmina i 20 % sacarosa en PBS) ON a 4°C en agitació lenta. Seguidament, es va fer un llit de gelatina + 9 % glutaraldehyd en un motlle circular d'1,5 cm de diàmetre i es va deixar solidificar durant 5 min. Després, es va col·locar l'epiteli al centre del llit solidificat tenint cura d'orientar correctament la mostra: les crestes en posició lateral i els utricles i sàculs en posició decúbit supí deixant l'epiteli ciliar exposat cap a dalt. Amb un trosset de paper es va retirar l'excés de gelatina líquida que pogués haver quedat al voltat de la mostra, tenint cura de no tocar l'epiteli ciliar, per tal de garantir una correcta inclusió d'aquest. Tot seguit, els epitelis es van recobrir amb gelatina + 9 % glutaraldehyd i es van deixar solidificar durant 15 min. Finalment, els blocs es van piramidar i es van post-fixar amb paraformaldèhid 4 % en PBS a pH 7,4 ON a 4°C.

Les mostres es van conservar dins PBS amb una gota de paraformaldèhid 4 % a 4°C fins que aquests es van tallar. El bloc de gelatina amb la mostra es va enganxar amb Loctite (Super Glue-3) sobre el suport del vibràtom en posició vertical, deixant el llit de gelatina sòlida darrere (davant de la ganiveta de tall), per tal de realitzar talls transversals dels epitelis vestibulars. Es van fer seccions de 40 µm al vibràtom Leica VT 1.000M, els talls es van muntar amb Mowiol 4-88 i es van deixar assecar ON a 4°C.

### **4.7.3 Microscòpia electrònica de rastreig**

Al final de l'exposició o la recuperació, les còclees i els vestíbuls van ser recollits, fixats i deshidratats per portar a terme una avaluació qualitativa de l'estat dels estereocilis a través del MER (Jeol 7400) a 2kV de voltatge.

#### **4.7.3.1 MER de la còclea**

Les rates profundament anestesiades van ser perfoses via intracardíaca amb sèrum fisiològic i heparina (1 %), seguit de 300 mL de glutaralhid a 2,5 % dins tampó cacodilat 0,2 M. Els animals van ser decapitats i es van extreure les còclees. Aquestes es van post-fixar per perfusió intra-laberíntica amb el mateix fixador i es van deixar dins durant 24 h a 4°C.

Seguidament, es van netejar amb el tampó cacodilat 0,2 M i es van post-fixar 1 h amb una solució de tetròxid d'osmi (1 % OsO<sub>4</sub> dins tampó cacodilat 0,2 M) abans de netejar-se de nou amb el tampó. Després, es va portar a terme la deshidratació amb solucions d'etanol de concentracions creixents (de 25 a 70°).

Les còclees es van fresar i es van dissecar per tal de deixar visible l'òrgan de Corti i es van continuar a deshidratar en concentracions creixents d'etanol fins arribar a 100°. Seguidament, es va procedir a assecar les mostres mitjançant el punt crític, que utilitza CO<sub>2</sub> líquid (Leica EM CPD300).

A continuació, es van muntar les mostres damunt un suport circular de llautó i es van envoltar amb laca de plata conductora i, finalment, es van recobrir d'or. Les mostres es van guardar al buit fins la seva observació al MER.

#### **4.7.3.2 MER de l'epiteli vestibular**

L'os temporal es va obrir ràpidament amb una pinça per tal de deixar entrar dins el vestíbul, de manera immediata, una solució de glutaraldehid 2,5% dins cacodilat de sodi 0,2M. Després de 48 h de fixació a 4°C, es va procedir a la dissecció de l'aparell vestibular (crestes, utricle i sàcul) i es van netejar les membranes que recobreixen els epitelis amb la lupa binocular.

Els teixits es van netejar amb cacodilat 0,2 M, es van post-fixar amb tetròxid d'osmi 1 % dins tampó cacodilat durant 1h i es van netejar. Els epitelis fixats es van posar dins una càpsula amb membranes poroses de 0,30 µm (Leica Microsystems SAS, 16771331242) per tal de permetre la difusió de l'aigua i l'etanol pel procés de deshidratació. Les mostres es van deshidratar amb concentracions creixents d'etanol fins arribar a 100° ON. Al dia següent es va procedir a assecar els epitelis mitjançant el punt crític, que utilitza CO<sub>2</sub> líquid (Leica EM CPD300).

A continuació, es van muntar les mostres damunt un suport circular de llautó aferrats en un adhesiu de carboni conductor (Electron Microscopy Sciences, 77825-09) i es van cobrir d'or. Les mostres es van guardar al buit fins la seva observació al MER.

## 4.8 Tècniques moleculars

Per tal d'analitzar les possibles lesions centrals es va portar a terme una **qPCR** del cerebel de diferents animals. Aquesta tècnica serveix per amplificar un fragment d'ADN d'interès.

Al final del període d'exposició, els animals es van anestesiar profundament amb una barreja de Ketamina (Clorkétam®, 75 mg/kg) i Xilacina (Rompún®, 5 mg/kg) via i.p i es van decapitar per tal d'extreure l'encèfal. Es va dissecar el cerebel i es van immersir dins nitrogen líquid abans de ser conservat a -80°C.

### 4.8.1 Extracció del ARN total

El protocol utilitzat per aquesta extracció va ser el basat en **tiocianat de guanidina (Trizol®, Invitrogen)**, derivat del protocol de Chomczynski, 1993. L'extracció es va realitzar dins eppendorfs «RNase free», sempre a baixa temperatura.

Les mostres es van tallar en trossos del voltant de 100 mg i es van col·locar dins tubs per tal de polvoritzar el material orgànic. Es va adjuntar 1,5 mL de Trizol® (Invitrogen) per tub i, amb ajuda de l'aparell FastPrep®-24 Classic Instrument (MP BIOMEDICALS), es van agitar els tubs a 4 m/s durant 30 s. Es va centrifugar el material a 12.000 g durant 10 min a 4°C (Centrifuge 5810/5810 R, eppendorf) i es va transferir la fase aquosa a un tub nou. Es va addicionar 200 µL de cloroform per cada mL de Trizol®, es va agitar el tub i es va incubar a TA durant 2/3 min. Es va tornar a centrifugar a 12.000 g durant 15 min a 4°C i es va transferir la fase aquosa a un nou tub. Es va addicionar 500 µL d'isopropil d'alcohol per cada mL de Trizol® i es va agitar lentament. Es va centrifugar el material orgànic a 12.000 g durant 10 min a 4°C i es va retirar la fase aquosa per obtenir l'àcid ribonucleic (ARN) precipitat (*pellet*). Es va netejar el *pellet* amb etanol 75° (1 mL d'etanol per 1 mL de Trizol®) i es va agitar. Finalment, es va centrifugar a 7500 g durant 5 min a 4°C per tal de quedar-se amb els ARNs precipitats i nets, i es van deixar assecar a TA durant alguns minuts per després resuspendre'ls dins 100 µL d'aigua «RNase free» i incubar-los a 65°C durant 5 min. Les mostres es van conservar a -80°C fins al moment de la seva utilització.

La quantitat de ARN total present es va mesurar per espectrometria amb l'aparell NanoPhotometer® P-Class (IMPLEN). La relació entre les longituds d'ones A260/A280 i A260/A230 són un indicador de la contaminació per proteïnes (puresa entre 2 i 2,2).

### 4.8.2 Tractament amb desoxiribonucleasa

Per tal d'eliminar qualsevol resta de ADN genòmic contaminant derivat de l'extracció dels ARN, les mostres es van tractar amb el *RNase-Free DNase Set* (Qiagen®). En primer lloc, 30 µL de ARN total es van tractar amb 2,5 µL de desoxiribonucleasa i 10 µL de Buffer RDD en un volum final de 100 µL amb aigua «RNase free». Els tubs es van incubar durant 10 min a TA. Per aconseguir la neteja total dels ADN, les mostres es van tractar amb el *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen®). Ràpidament, es va addicionar 350 µL de Buffer RLT plus a cada tub i 250 µL d'etanol absolut, es va homogeneïtzar la mescla i es va transferir a tubs en columnes i centrifugar 15 s a 8.000 g. Es va addicionar 500 µL de Buffer RPE i es va tornar a centrifugar (es va repetir aquest darrer pas 2 vegades). Finalment es va recuperar la columna es va posar dins un tub eppendorf nou on es va addicionar 50 µL d'aigua «RNase free» i es va centrifugar durant 1 min a 8.000 g per tal de recuperar tot l'ARN.

### 4.8.3 Anàlisi de la qualitat dels ARNs

Es verifica la qualitat dels ARN a través de dues tècniques diferents. Per una part, amb la visualització de les bandes 18S i 28S d'ARN ribosòmic sobre un gel d'agarosa 2 %, per altra banda amb l'anàlisi de les mateixes fraccions ribosòmiques i el numero RIN (*RNA integrity number*) a través de l'aparell 2100 Bioanalyser (Agilent).

Per preparar el gel, es va pesar 1 g d'agarosa (electron) i es va dissoldre, amb l'ajuda d'un microones, dins 100 mL de TAE 1 %. Es va addicionar 1 µL de GelRed. Es va abocar el líquid en el motlle i es va deixar solidificar durant almenys 1 h. Seguidament, es van carregar 10 µL de cada mostra juntament amb 2 µL de tampó de carrega i 3 µL d'aigua «RNase free». Es va fer migrar les mostres durant 1 h a 300 mA i 100 V. Per acabar, es va observar amb l'aparell Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad) i el logiciel “Quantify One”.

Per portar a terme l'anàlisi a través del 2100 Bioanalyzer s'utilitza el kit *Agilent RNA 6.000 Nano* (Agilent Technologies). Breument, es va dipositar 9 µL de Gel-dye mix al xip i es va escampar amb l'ajuda d'una xeringa. Es va dipositar 5 µL de marcador dins cada pou, 1 µL de ladder dins el pou corresponent pel control, i 1 µL de mostra a cada un dels pous. El xip es va homogeneïtzar amb l'ajuda d'un vòrtex, i es va analitzar amb el logiciel “2100 Expert”.



#### 4.8.4 Síntesis del ADN complementari (ADNc)

En genètica, l'ADN complementari (ADNc) és ADN sintetitzat a partir de ARN missatger madur. Aquesta síntesis es porta a terme amb el kit *iScript<sup>TM</sup> Adv cDNA kit for RT-qPCR*.

Es dilueix l'ARN per obtenir una concentració de 100 ng/μL dins 30 μL d'aigua «RNase free». Es va addicionar a cada tub el mixRT: 4μL de reactiu 5x (*iScript<sup>TM</sup> Advanced Reaction Mix*), 1 μL d'enzim transcriptasa inversa (*iScript<sup>TM</sup> Advanced Reverse Transcriptase*), 5 μL d'aigua «RNase free». Es va adjuntar 10 μL del ARN diluït i es van fer els corresponents blancs i controls. Es van posar els tubs al termociclor (Eppendorf® Mastercycler) utilitzant el protocol següent: 5 min a 25°C + 30 min a 42°C + 5 min a 85°C + α a 4°C.

Les mostres es van conservar a -20°C fins al moment de la seva utilització.

#### 4.8.5 Amplificació PCR

La reacció de la PCR és la part on ens que permet determinar la quantitat d'ADN o ARN presents a la mostra original o identificar amb una fiabilitat molt elevada mostres d'ADN específics a partir de la seva temperatura de fusió (també anomenat valor *t<sub>m</sub>*, de l'anglès *melting temperature*). En les tècniques basades en fluorocroms, l'ADN multiplicat a cada cicle s'uneix al fluorocrom (generalment SYBR Green) produint una fluorescència mesurada pel termociclador apte per la PCR en temps real.

Les reaccions d'amplificació es porten a terme en el CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), amb un programa que conté diferents etapes.

#### 4.8.5.1 Placa amb gens característics de la neurotoxicitat

Els *PrimePCR SAB target panels* (Bio-Rad) són un recull de gens característics en un procés biològic concret, una malaltia o via biològica específica. Els gens presents a cada panell representen un conjunt divers de molècules de senyalització. En el nostre cas, es va utilitzar la placa *Neurotoxicity (SAB Target List) H96* (Fig. M22).

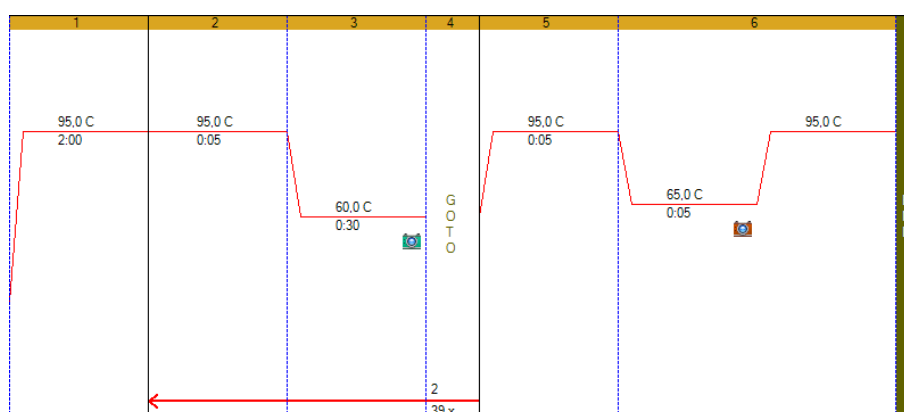
**BIO-RAD** Plate Name: **Neurotoxicity (SAB Target List) H96**  
Sep 11, 2017 | Print

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ABL1	BAG4	CD8B	CRADD	EREG	GSN	HTR3A	NOL3	PLP1	TNFRSF10B	TRPM4	HPRT1	A
B	ACTB	BDNF	CDKN1A	DAPK1	FAS	GSR	IL10	NOS1AP	POU1F1	TNFRSF11B	TXNIP	gDNA	B
C	ANGPTL4	BIK	CDO1	DDIT3	FASLG	GUCY1A3	KIT	NOSIP	RASD1	TNFRSF25	TYRP1	PCR	C
D	ARG1	BIRC2	CIDEA	DRD2	GAL	GUSB	LDHA	NOSTRIN	RPLP0	TP53	USP7	RQ1	D
E	ARG2	CAMK2A	CIDEB	DRP2	GALC	HEPH	LEFTY2	NOTCH4	SFXN5	TPH1	XIAP	RQ2	E
F	ARRB1	CAMK2D	CLCN5	DYNLL1	GCH1	HSP90AA1	LTA	NUP50	SLC18A3	TRAF2	YWHAE	RT	F
G	ATF4	CASP7	CLCNKA	EGLN3	GPR37	HSPA5	MMP9	PAPPA	SOD2	TRAF4	TBP		G
H	B2M	CCND1	COL12A1	EIF2AK3	GRIN1	HTR1A	NFKB1	PDIA4	TACR1	TRPM1	GAPDH		H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Figura M22.** Placa Neurotoxicity utilitzada per portar a terme la PCR. Font: Bio-Rad.

Es va preparar la solució que contenia 12 µL de ADNc, 1,1 µL de 2x SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal Supermix (Bio-Rad) i 1,088 µL d'aigua «RNase free». Es van dipositar 20 µL de solució per pou.

El protocol d'amplificació va ser el següent: 95°C durant 2 min, seguit de 40 cicles a 95°C durant 5 s per tal de desnaturalitzar la mostra i a 60°C durant 30 s pel procés d'hibridació, i, per finalitzar, una *melt curve* de 65-95°C (Fig. M23).



**Figura M23.** Condicions de la PCR. Font: Bio-Rad.

Els canvis d'expressió dels gens d'interès es van analitzar com el cicles animals exposats respecte animals controls relativament als tres gens constituents (*Gapdh*, *Tbp* i *Hprt*).

#### 4.8.5.2 PCR dels gens *lta*, *mmp9*, *Il10*, *cdkn1a*, *cideb* i *trpm1*

Es van escollir 6 gens que, amb la placa, havien sortit amb diferències significatives entre el grup exposat i el control. Els gens van ser els següents: *lta*, *mmp9*, *Il10*, *cdkn1a*, *cideb* i *trpm1* (Bio-Rad). Les reaccions d'amplificació es van portar a terme en presència de iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) i els promotors PCRTM de cada un dels gens segons el protocol del proveïdor.

El protocol d'amplificació va ser el següent: 95°C durant 5 min, seguit de 35 cicles a 95°C durant 15 s per tal de desnaturalitzar la mostra i a 60°C durant 60 s pel procés d'hibridació.

Els canvis d'expressió dels gens d'interès es van plasmar com el cicles animals exposats respecte animals controls relativament als tres gens constituents (*β-actina*, *Rpl13* i *Hprt*).

#### 4.8.5.3 Anàlisi dels resultats de la PCR

L'anàlisi dels resultats es va portar a terme amb el programa *Bio-Rad CFX Manager*. Es va utilitzar el mètode de la  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  per calcular l'expressió dels gens d'interès:

$Ct$  = llindar de cicles (nombre de cicles que s'han d'assolir perquè el gen superi un cert nivell de fluorescència).

$$Ct_{\text{gens constituents}} = (Ct_{\text{Gen1}} + Ct_{\text{Gen2}} + Ct_{\text{Gen3}})/3$$

$$\Delta Ct_{\text{exposats}} = Ct_{\text{gens constituents exposats}} - Ct_{\text{gen d'interès exposats}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct_{\text{gens constituents controls}} - Ct_{\text{gens d'interès controls}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{mitjana}(\Delta Ct_{\text{exposats}}) - \text{mitjana}(\Delta Ct_{\text{control}})$$

## 4.9 Anàlisis estadístics

Les anàlisis estadístiques es van portar a terme amb el programa estadístic **Statgraphics Centurion XVI versió 16.2.04** i el programa **Prism V7.03 (GraphPad. Software Inc., La Jolla, CA)**. Els resultats estadístics s'expressen de la següent manera:  $F(df_b, df_r) = F\text{-ratio}$ ;  $p = \text{valor } p$ , on  $df_b$  és el nombre de graus de llibertat inter-grups, i  $df_r$  és el nombre de graus de llibertat intra-grups. La  $F\text{-ratio}$  és la mitjana del quadrat dels valors entre grups, dividit per la mitjana del quadrat dels valors intra-grup. El nivell de significació estadística ( $\alpha$ ) es va establir a 95 % ( $p < 0,05$ ). Tots els resultats es van representar com la mitjana  $\pm$  SEM.

Les **concentracions sanguínies i cerebrals de CS<sub>2</sub>**, les **concentracions de TTCA en l'orina** i el **percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades** van ser analitzades amb un anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor. L'anàlisi *post-hoc* es va realitzar utilitzant el mètode de Bonferroni, per tal de comparar les variacions entre cada un dels grups analitzats.

Les **dades de la RT-qPCR** es van analitzar a través del test de Mann-Whitney. Les dades es van representar com a les medianes [Q1; Q3], amb Q1 i Q3 que corresponen als quartils 25 % i 75 %, respectivament.

Igualment, un anàlisi ANOVA d'un factor ha estat utilitzat per analitzar les **variacions de l'amplitud del PDA** entre animals exposats i controls per cada freqüència mesurada. Al final de l'exposició, les variacions corresponen a  $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0] - K1$ . La constant  $K1$  és la mitjana de  $[PDA1 - PDA0]$  del grup control corresponent. Per la freqüència a 3,6 kHz, la mitjana i la desviació estàndard va ser avaluada utilitzant el model "Tobit", el qual permet tenir en compte els valors de mesura de PDA que es troben pròxims o, fins i tot, dins del soroll de fons. Després de 4 setmanes de recuperació, les variacions corresponen a  $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0] - K2$ . La constant  $K2$  és la mitjana de  $[PDA2 - PDA0]$  del propi grup control. Un anàlisi *post-hoc* també va ser realitzat utilitzant el mètode de Bonferroni.

L'anàlisi estadístic de les variacions dels diferents **paràmetres enregistrats del NPR** (nombre de sacades, durada total de les sacades i pendent d'amortiment), dels diferents **tests de comportament** (*tail-lift reflex*, *air-righting reflex*, superfície, errors de les potes i temps de la travessia) i de la **variació del pes corporal** dels animals, es va portar a terme per una ANOVA de dos factors de mesures repetides, amb "tractament" i "temps" com a factors. Es van realitzar comparacions *post-hoc* utilitzant el mètode de Bonferroni per comparar cada grup exposat vs. el seu valor basal (T0). Les dades del NPR es van mostrar com a percentatge respecte els valors basals a causa de la gran variabilitat inter-individual de les mesures.



## **5 . RESULTATS**



## **5.1. CAPÍTOL I:**

### **EFFECTE DE LA CO-EXPOSICIÓ AL SOROLL RIC EN BAIXES FREQUÈNCIES I AL CS<sub>2</sub>**





L'exposició al soroll, com s'ha dit, pot causar una pèrdua auditiva. La pèrdua auditiva induïda pel soroll ric en baixes freqüències difereix amb la pèrdua induïda pels sorolls de mitjanes o altes freqüències. Les baixes freqüències causen dèficits auditius en una finestra de freqüències més ampla i, com és lògic, en primer lloc causen danys a la part apical de la còclea (Bohne and Harding, 2000; Burdick, 1982). No obstant, la naturalesa del dany causat per aquest tipus de soroll no està ben descrit en la literatura.

A més de causar dany coclear, alguns autors han mencionat que el soroll, concretament el soroll de baixes freqüències, podia ser també detectat pel receptor vestibular i, fins i tot, danyar-lo (Cazals et al., 1982; Tamura et al., 2012).

El CS<sub>2</sub> té la capacitat de crear axonopaties neurofilamentoses (Llorens, 2013), que afecten tant a les neurones sensorials com motores (Hirata et al., 1996; Johnson et al., 1983; Takebayashi et al., 1998). A més, Rebert and Becker, 1986, i Hirata et al., 1992, van demostrar que el CS<sub>2</sub> causa axonopaties en les fibres de les vies auditives de rates exposades.

En els llocs de treball, l'exposició al CS<sub>2</sub> generalment s'associa amb la co-exposició amb el soroll. Segons Morata, 1989 i Chang et al., 2003, la pèrdua auditiva és més freqüent i greu amb co-exposició, com s'ha demostrat ja amb altres solvents (Campo et al., 2013). Aquesta pèrdua auditiva es dona a la regió coclear dedicada a discriminar les baixes freqüències. Igualment, es va trobar que el CS<sub>2</sub> pot afectar l'equilibri dels humans (Sułkowski et al., 1992). Tot i així, s'han realitzat molt pocs estudis de co-exposició soroll + CS<sub>2</sub> i no s'ha portat a terme cap anàlisi histològic per saber l'origen d'aquestes pertorbacions.

Per aquestes raons, el principal propòsit d'aquesta part de l'estudi és analitzar els efectes sobre l'equilibri i l'audició de les rates de la co-exposició al soroll de baixa freqüència sol i a 250 ppm de CS<sub>2</sub>, respecte les exposicions al soroll o al solvent sol. L'impacte sobre l'audició es mesura a través dels PDA i l'estat de l'equilibri s'analitza a través del RVO i diferents tests de comportament. Aquestes mesures es completen amb anàlisis histològics dels receptors perifèrics i una qPCR del cerebel.

El protocol experimental (Fig. M1) i el nombre de rates utilitzades per aquesta part de l'estudi (Taula M1) es troben a l'apartat de *Material i Mètodes*.

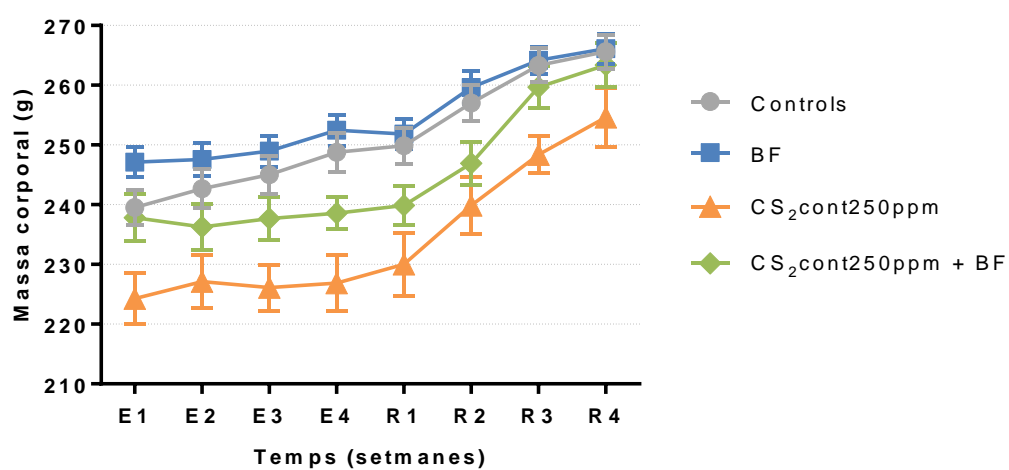
### 5.1.1 Salut general dels animals

Cada setmana es va pesar i supervisar l'estat de salut general de totes les rates involucrades en les diferents exposicions al soroll i/o al CS<sub>2</sub>. Està descrit que el CS<sub>2</sub> causa una pèrdua de pes en les rates quan aquestes són exposades a altes dosis de solvent i durant un llarg període de temps (Hirata et al., 1992; Rebert and Becker, 1986), motiu pel qual es van anar controlant contínuament els animals d'acord amb el protocol estàndard definit per Morton and Griffiths, 1985 (Annex 1).

Les rates van arribar a l'estabulari amb un pes entre 150 i 180 g, i passat el període de quarantena i el període d'estabulació (8 setmanes en total) van assolir un pes d'entre 220 i 250 g, moment en el qual es van realitzar les primeres mesures de la funció vestibular i auditiva.

Com es pot observar a la Figura R1, el grup control (n = 37) i el grup exposat a soroll sol (n = 25) van mostrar un augment de pes constant durant les 4 setmanes d'**exposició**, amb un guany de 9,3 g i 5,4 g, respectivament. En canvi, durant aquest mateix període de temps, el pes dels animals exposats a CS<sub>2</sub> (n = 8) o CS<sub>2</sub> + soroll (n = 19) va augmentar menys, amb un increment de 2,6 g i 0,7 g, respectivament. L'ANOVA de dos factors va indicar que la interacció "tractament" x "temps" durant el període d'exposició era significativa [F(9,438) = 9,21; p < 0,0001]. El test de Bonferroni va indicar diferències en el pes dels animals control al llarg de totes les setmanes d'exposició respecte el seu pes inicial, i pel grup exposat al soroll sol a partir de la segona setmana d'exposició. En canvi, els grups exposats al solvent no presentaven diferències significatives al llarg del període d'exposició respecte el seu pes inicial, tant els co-exposats com els exposats al solvent sol. No obstant, tots els animals presentaven un estat saludable i no apareixia cap signe de patiment evident; no van manifestar signes de debilitat, la taxa d'ingesta d'aliments era normal, i el seu pèl tenia un aspecte saludable.

Durant les 4 setmanes de **recuperació**, els animals exposats a CS<sub>2</sub> o CS<sub>2</sub> + soroll van tenir un augment de pes major (27,8 g i 24,8 g, respectivament) que els exposats al soroll sol o que el grup control (13,6 g i 16,9 g, respectivament) (Fig. R1). Així doncs, al final de les 4 setmanes de recuperació (T2), la mitjana del pes corporal de tots els grups d'animals era similar [F(3,85) = 1,27; p = 0,2911].



**Figura R1.** Evolució del pes corporal de les rates al llarg del període d'exposició (E) i el període de recuperació (R) per a tots els grups experimentals. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

## 5.1.2 Efecte sobre el sistema auditiu

### 5.1.2.1 Funció auditiva: productes de distorsió acústics

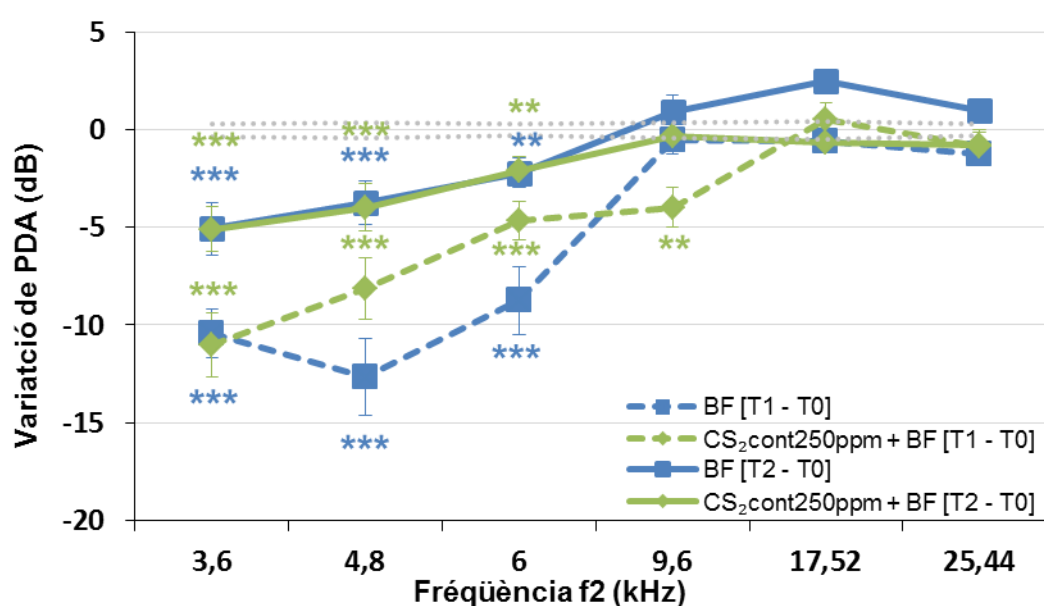
Al final del període d'**exposició** el soroll ric en baixes freqüències amb una  $L_{EX,8h}$  de 105 dB SPL va causar una disminució significativa de les amplituds dels PDA entre 3,6 i 6 kHz, tant si es trobava sol com co-exposat amb el CS<sub>2</sub> (Fig. R2). No obstant això, quan el soroll es trobava en co-exposició també es va causar una pèrdua significativa a 9,6 kHz ( $p = 0,0115$ ). Com a resultat, la gamma de freqüències afectada en la co-exposició era més àmplia que l'obtinguda amb l'exposició al soroll sol. A més a més, la variació de l'amplitud dels PDA a 4,8 i 6 kHz van ser lleugerament inferiors en la co-exposició respecte l'exposició al soroll sol, és a dir, hi havia una menor pèrdua auditiva en baixes freqüències quan el soroll es trobava juntament amb el solvent, així i tot, aquesta diferència no era significativa ( $p = 0,1226$  i  $p = 0,0702$ , respectivament).

La màxima variació d'amplitud dels PDA al final del període d'exposició pel grup exposat al soroll sol era a 4,8 kHz ( $-12,6 \pm 2$  dB), mentre que pel grup co-exposat era a 3,6 kHz ( $-11 \pm 1,7$  dB). Per tant, si es comparen aquestes freqüències amb l'espectre del soroll d'exposició (de 0,5 a 2 kHz), es veu que la pèrdua màxima es produïa més o menys a una octava per sobre de l'espectre de soroll generat.

Tal i com s'explica a l'apartat de *material i mètodes*, el valor de les amplituds dels PDA a 3,6 kHz es calcula a través del model "Tobit" per tots els grups d'exposició. Abans de l'exposició, les amplituds dels PDA a 3,6 kHz ja eren inferiors que les amplituds de les altres freqüències (uns 12 dB). Per tant, la pèrdua auditiva en aquesta freqüència com a conseqüència del tractament fa impossible la mesura dels valors que es trobaven sota del soroll de fons, és a dir, la mesura dels animals amb major pèrdua. En canvi, després de 4 setmanes sense soroll, totes les rates van tenir la suficient recuperació per fer possible la mesura dels PDA en totes les freqüències i, no s'utilitza en aquest cas el model "Tobit" després d'aquest període (T2).

Després de les 4 setmanes de **recuperació** el rang de freqüències danyades amb la co-exposició era idèntic a l'obtingut per l'exposició al soroll sol; de 3,6 a 6 kHz (Fig. R2). Encara que es va produir una recuperació, aquesta no era suficient per arribar als valors control, i seguim trobant diferències significatives a 3,6, 4,8 i 6 kHz respecte els animals control. Això no obstant, no s'observen diferències a 9,6 kHz, de manera que l'ampliació de la finestra de freqüències danyades pel solvent sols va ser temporal.

Les màximes variacions del PDA al final del període de recuperació es trobaven a 3,6 kHz en ambdós grups ( $-5,1 \pm 1,3$  dB pel grup soroll sol i  $-5,1 \pm 1,2$  dB pel grup co-exposat).



**Figura R2.** Variacions dels PDA del grup exposat al soroll de baixa freqüència sol i a 250 ppm continu de CS<sub>2</sub> + soroll de baixa freqüència. BF: soroll ric en baixes freqüències. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni. Pèrdua auditiva al final del període d'exposició:  $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposats} - [PDA1 - PDA0]_{Controls}$ . Pèrdua auditiva al final del període de recuperació:  $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposats} - [PDA2 - PDA0]_{Controls}$ . Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. La línia de punts representa la variabilitat del grup control (SEM) al final del període d'exposició. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , significativament diferent a la mitjana dels controls, test de Bonferroni.

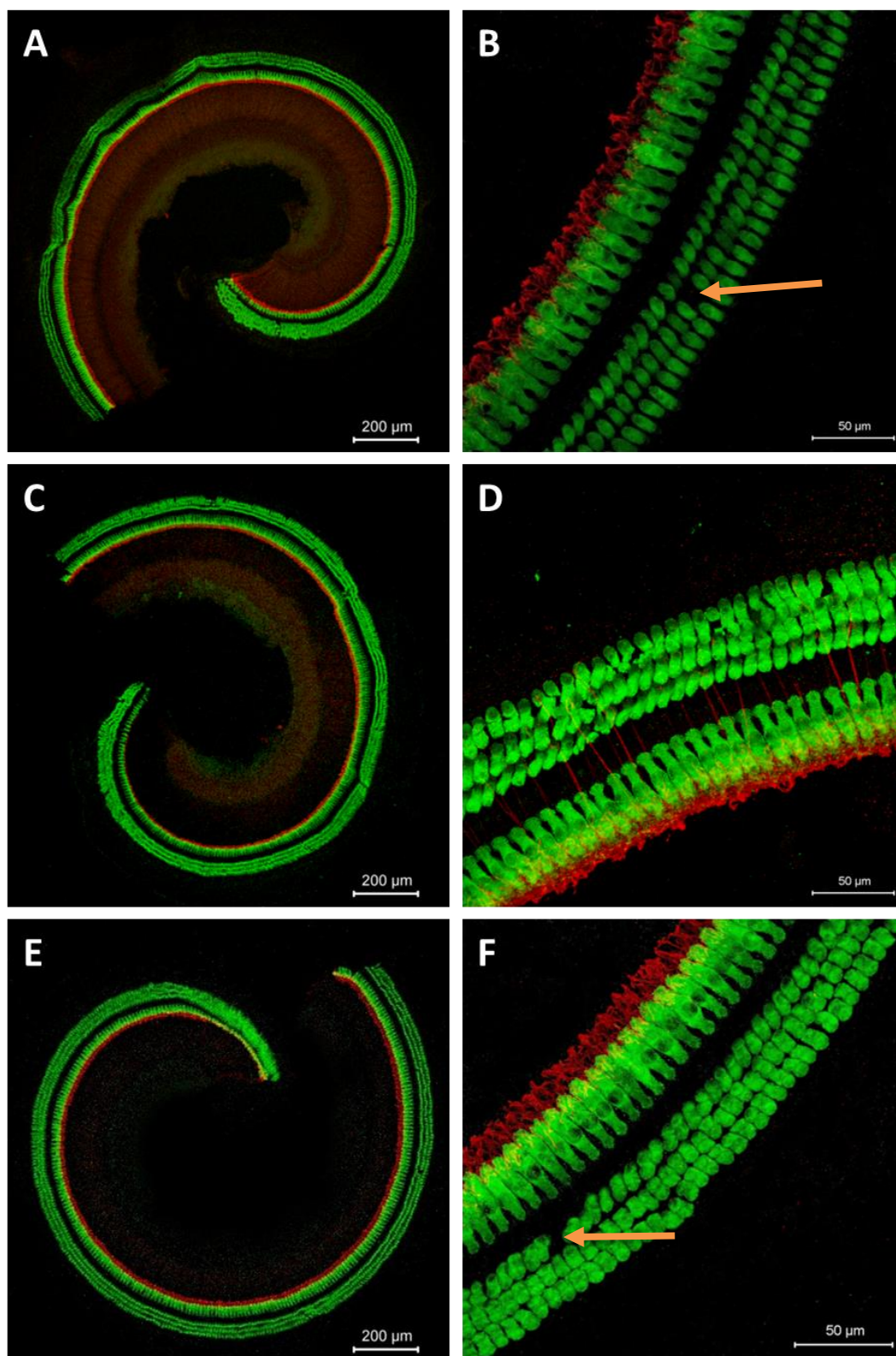
### **5.1.2.2 Anàlisis histològiques**

#### **5.1.2.2.1 Immunohistoquímica de la còclea**

Per tal d'avaluar la possibilitat que hi hagués un dany a les fibres aferents o pèrdua cel·lular, es va estudiar per IHQ i microscòpia de fluorescència confocal l'estat de les fibres aferents i les cèl·lules ciliades. La literatura indica que el CS<sub>2</sub> pot causar una axonopatia neurofilamentosa distal (Llorens, 2013).

L'observació de la còclea marcada amb els anticossos anti-miosina VIIa i anti-neurofilament va revelar unes característiques morfològiques similars en tots els animals controls (n = 11; 6 a T1 i 5 a T2), exposats al soroll sol (n = 8; 4 a T1 i 4 a T2) i co-exposats (n = 7; 4 a T1 i 3 a T2), al final de l'exposició i després del període de recuperació, i en tots els segments coclears (part basal, mitjana i apical).

Com es mostra a la Figura R3, es poden identificar les tres files de CCE i una fila de CCI gràcies al marcatge de l'anticòs anti-miosina VIIa. Les observacions no van revelar cap pèrdua cel·lular evident relacionada amb el tractament. L'anticòs anti-neurofilament va marcar les terminals aferents que es troben en contacte amb les CCI. No es va observar cap diferència a les terminals nervioses entre els animals exposats i controls, ja sigui al final de l'exposició o després que el període de recuperació. Ni el soroll (Fig. R3C-D) ni la co-exposició a 250 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll (Fig. R3E-F) van causar efectes evidents en la distribució de les fibres aferents i en el contingut de neurofilaments.

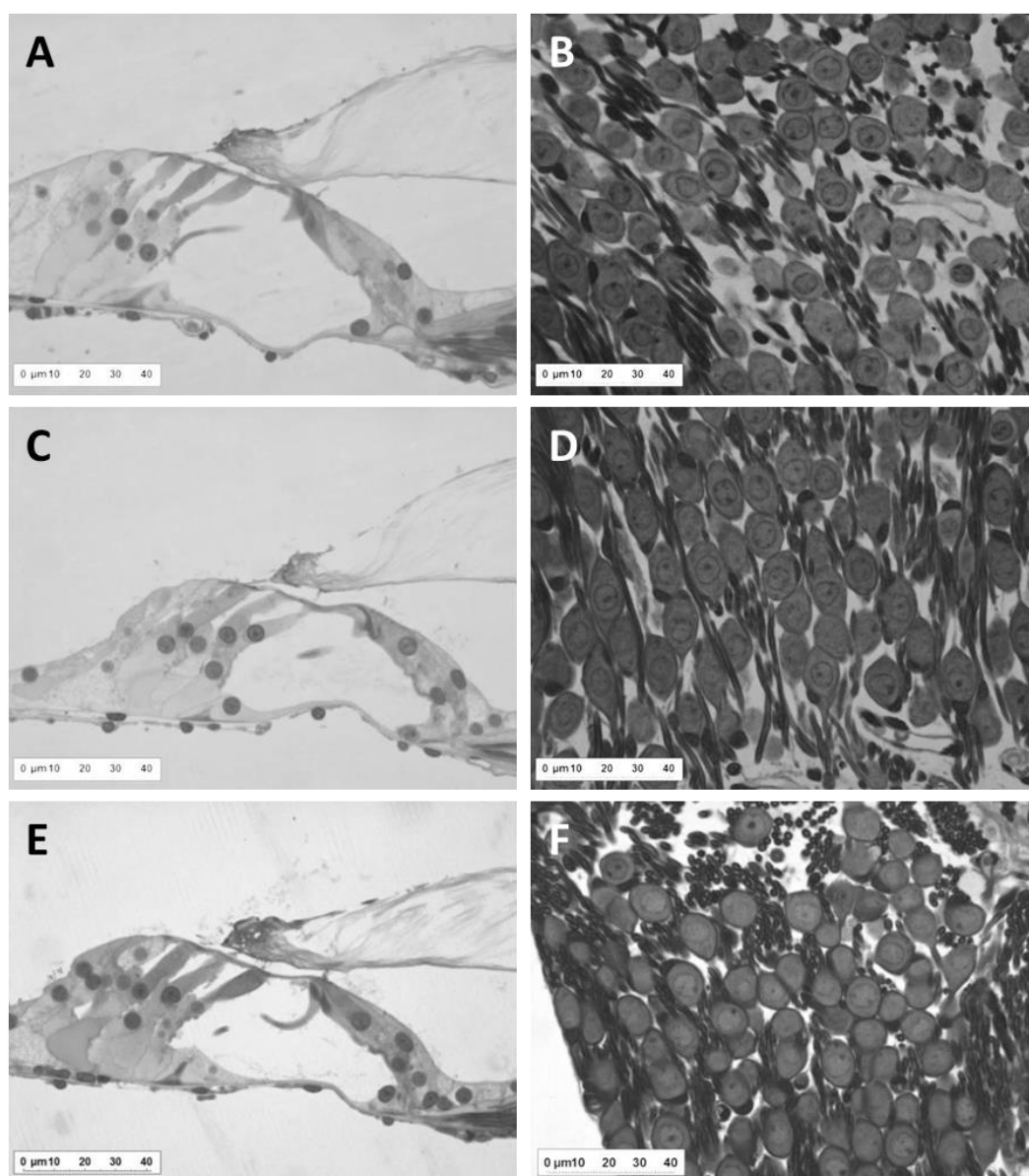


**Figura R3.** Imatges representatives d'alguns animals al final de les 4 setmanes d'exposició amb microscòpia òptica de fluorescència confocal de l'epiteli sensorial auditiu on es mostra l'òrgan de Corti marcat amb anticòs anti-miosina VIIa (verd) i anti-neurofilament (vermell). El groc indica una superposició de les senyals vermells i verdes. (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat al soroll sol. (E-F) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni + soroll. Esquerra: Volta apical de la còclea. Dreta: Volta mitjana de la còclea. Les fletxes a B i F marquen la localització d'una cèl·lula absent.



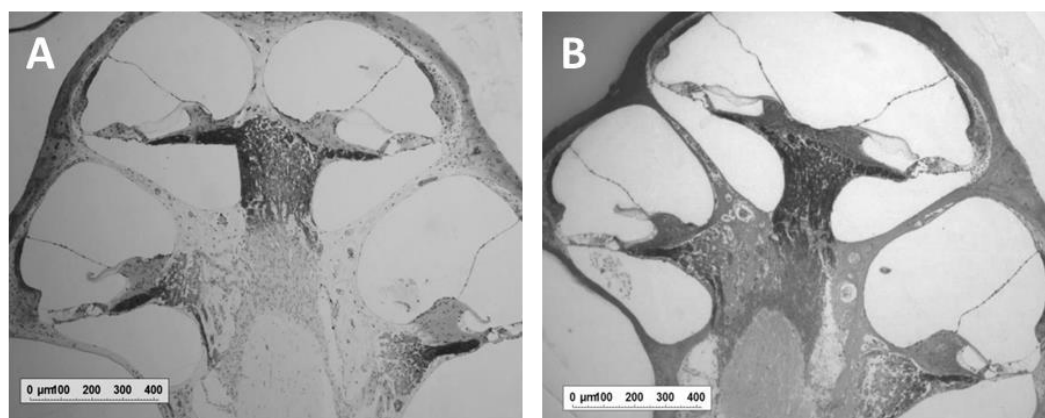
#### **5.1.2.2.2 Talls semi-fins de la còclea (òrgan de Corti + gangli espiral)**

Per tal d'observar si existeixen canvis estructurals causats per un possible efecte ototòxic del CS<sub>2</sub>, es van examinar els òrgans de Corti i els ganglis espirals per microscòpia òptica dels animals control (n = 5), els animals exposats al soroll sol (n = 6) i els animals co-exposats a 250 ppm de CS<sub>2</sub> (n = 7). Es van analitzar entre 25 i 30 seccions semi-fines de còclees incloses dins resina epoxi per a cada animal, on es va avaluar l'òrgan de Corti de les tres parts (basal, mig i apical) i els respectius ganglis espirals.



**Figura R4.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea observats al final de l'exposició. (A- B) Animal control. (C-D) Animal exposat a soroll sol. (E-F) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni + soroll. Esquerra: Òrgan de Corti amb les tres cèl·lules ciliades externes i una cèl·lula ciliada interna, amb la membrana tectorial unida als estereocilis. Dreta: Cossos cel·lulars de neurones ganglionars del gangli apical.

En tots els talls observats, la morfologia va ser similar a la descrita en la literatura per a les rates control adultes (Fig. R4A-B). En l'òrgan de Corti es van observar les CCI, tres files de CCE, cèl·lules de Deiters i cèl·lules de Hensen amb característiques morfològiques normals. Així doncs, tant al final de les 4 setmanes d'exposició (Fig. R4), com després del període de recuperació (Fig. R5) la morfologia normal es manté en tots els grups i en totes les regions cocleares. Això inclou la volta apical de la còclea, la regió dedicada a la discriminació de les baixes freqüències, de les rates exposades a 250 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll després de les 4 setmanes d'exposició. Igualment, les cèl·lules del gangli espiral no van ser malmeses pel solvent. Per tant, la morfologia general de les còclees es va mantenir intacta, independentment de l'exposició i el moment.

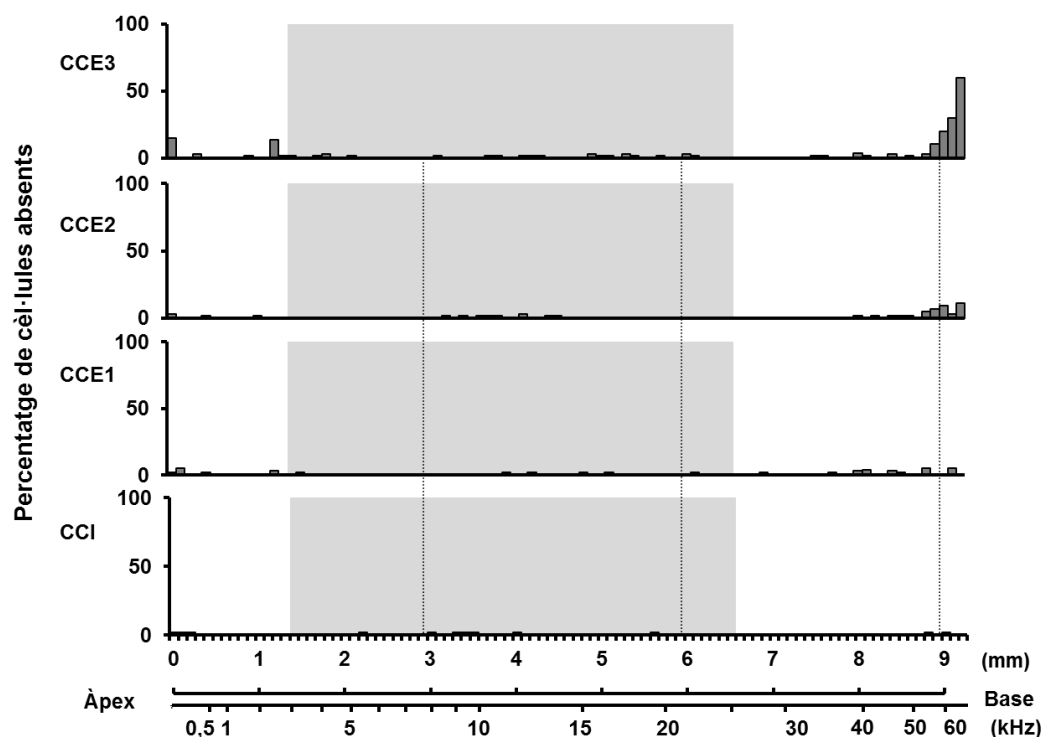


**Figura R5.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea observats al final del període de recuperació. (A) Animal control. (B) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.

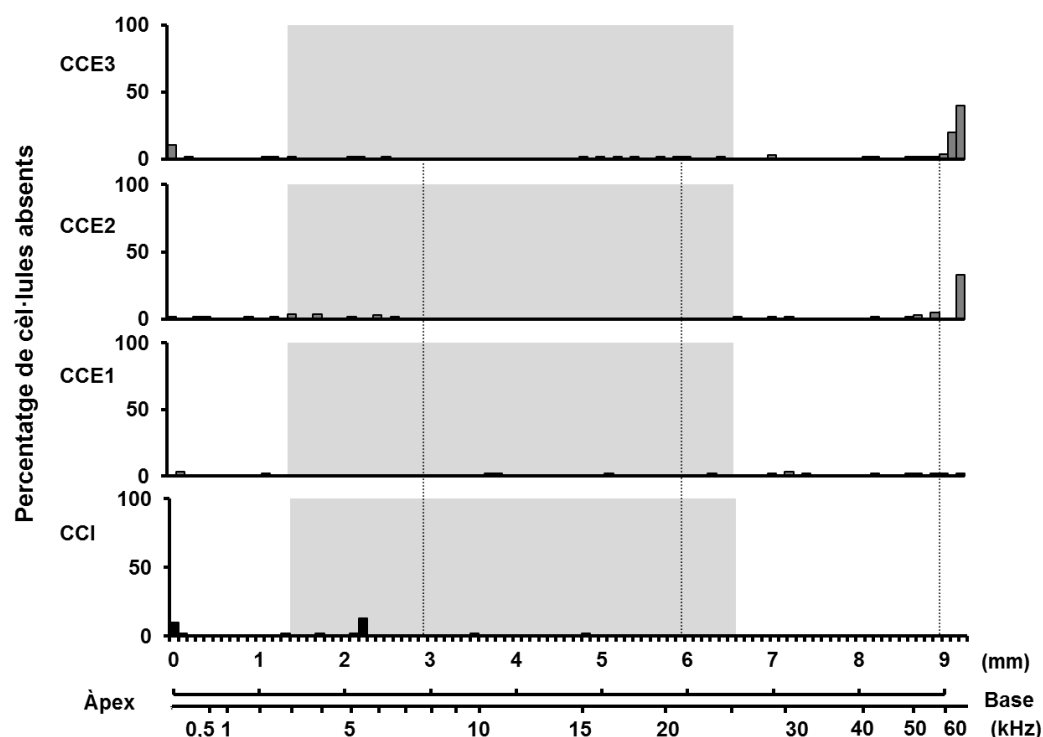
### 5.1.2.2.3 Cocleograma

Després d'un període de recuperació de 4 setmanes, es va fer un recompte de les cèl·lules ciliades a través del microscopi òptic per tal de plasmar el percentatge de pèrdua cel·lular.

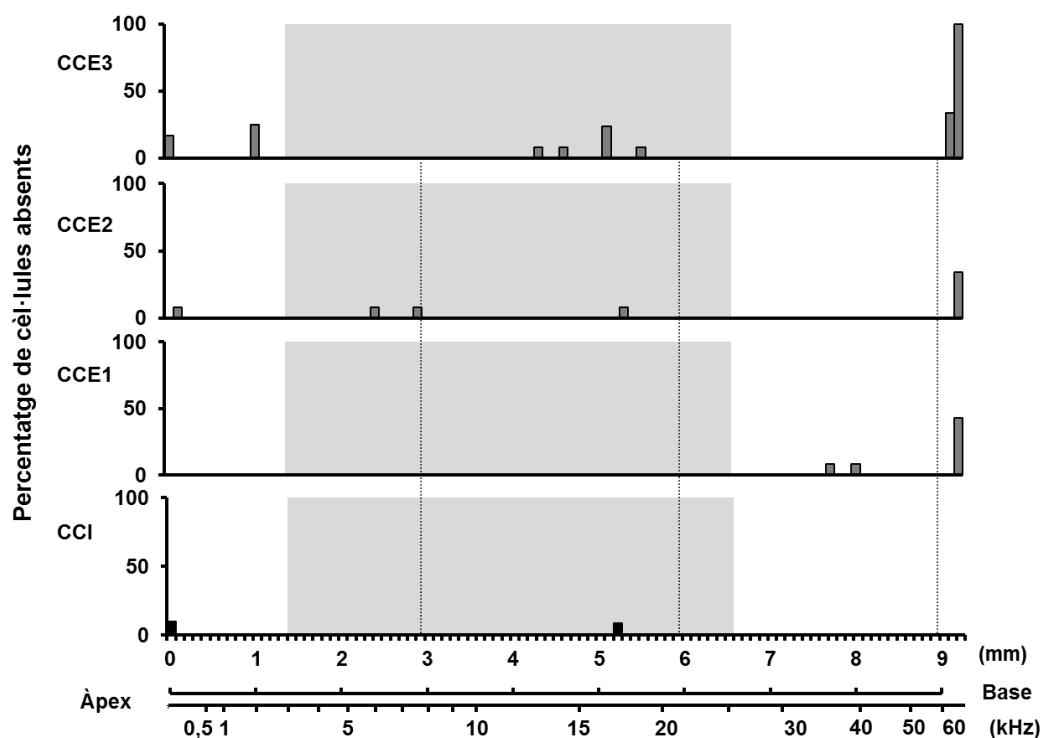
Els cocleogrames obtinguts a partir dels grups control (Fig. R6) i els grups exposats (Fig. R7 i R8) van ser similars. Independentment del grup, es va observar l'absència de quantitats molt petites de cèl·lules al llarg de l'òrgan de Corti. En tots els grups, la pèrdua de CCI i CCE de la primera fila mai va excedir l'1 %, i pèrdues d'entre 1 i 2 % es van obtenir en la segona i tercera files de CCE. Així doncs, tot i trobar una pèrdua d'audició significativa en els diferents grups exposats, no hi va haver una pèrdua cel·lular visible.



**Figura R6.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates controls 4 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.



**Figura R7.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates exposades al soroll sol 4 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.



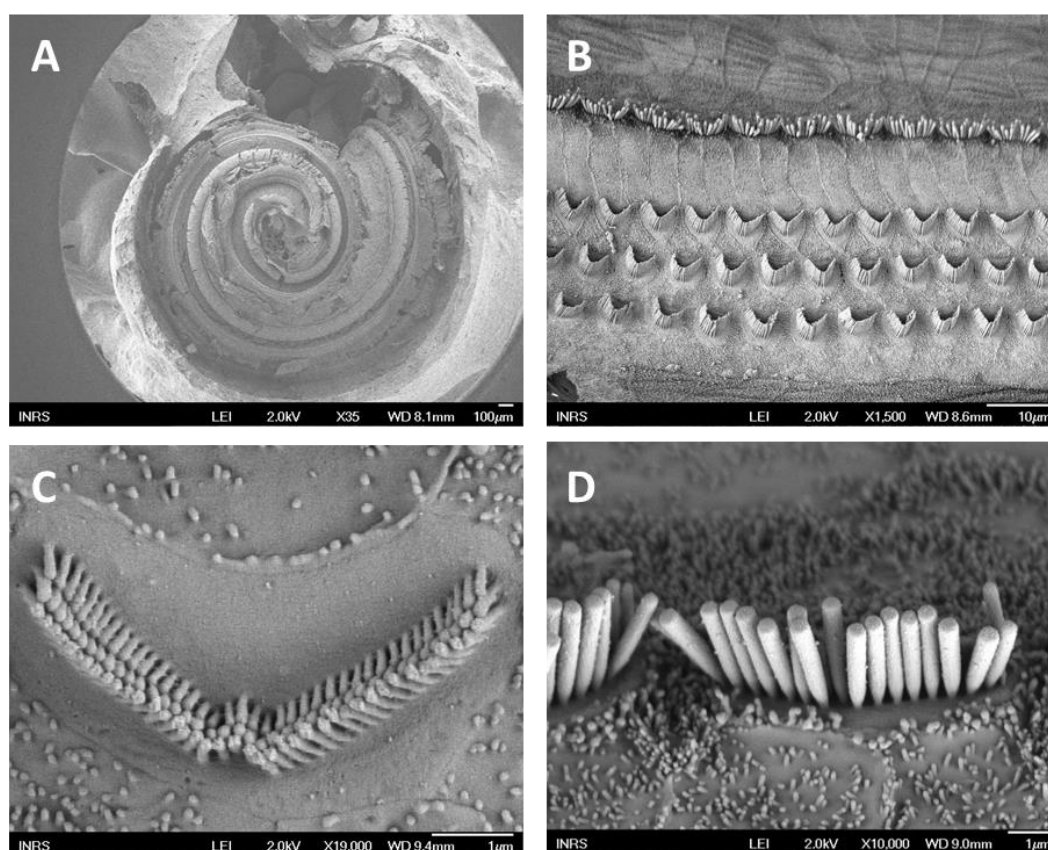
**Figura R8.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 4$ ) de rates exposades a 250 ppm de  $CS_2$  + soroll 4 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.

L'absència d'algunes CCE a l'extrem basal (més de 50 kHz) plasmades al cocleograma, no es deu a l'exposició al  $CS_2$  ni al soroll, sinó a la morfologia de l'òrgan de Corti. L'òrgan de Corti s'estreny a la base de la còclea, fent que sols les CCI estiguin presents. A mesura que s'eixampla vers l'àpex apareix la primera fila de CCE, llavors la segona i, finalment, la tercera. Per tant, l'absència d'algunes CCE a la base de la còclea és un fet corrent.

#### 5.1.2.2.4 MER de la còclea

Els epitelis sensorials auditius es van observar per microscòpia electrònica de rastreig a les rates control ( $n = 5$ ), rates exposades al soroll de baixa freqüència sol ( $n = 5$ ) i rates co-exposades a 250 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll ( $n = 6$ ) al final del període de recuperació.

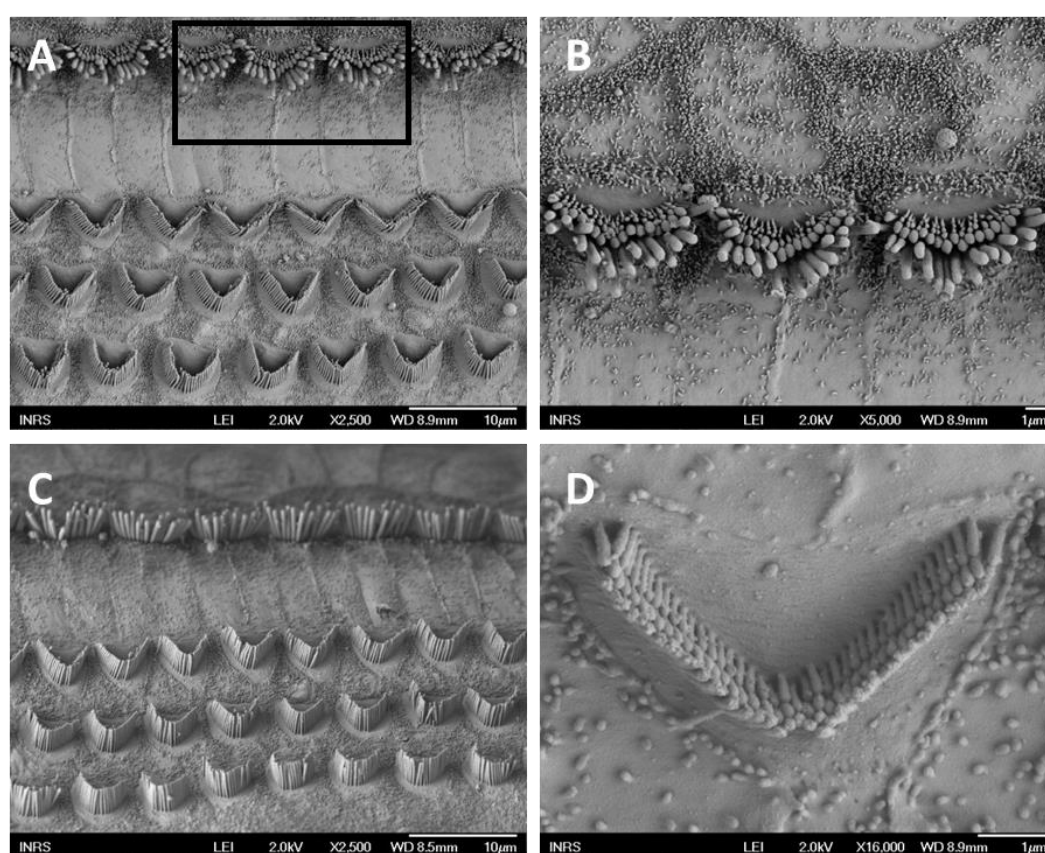
La Figura R9 mostra observacions histològiques de l'epiteli sensorial dels animals controls que confirmaven que aquests animals presentaven les mateixes característiques morfològiques que les rates adultes normals descrites a la literatura (Robles and Ruggero, 2001).



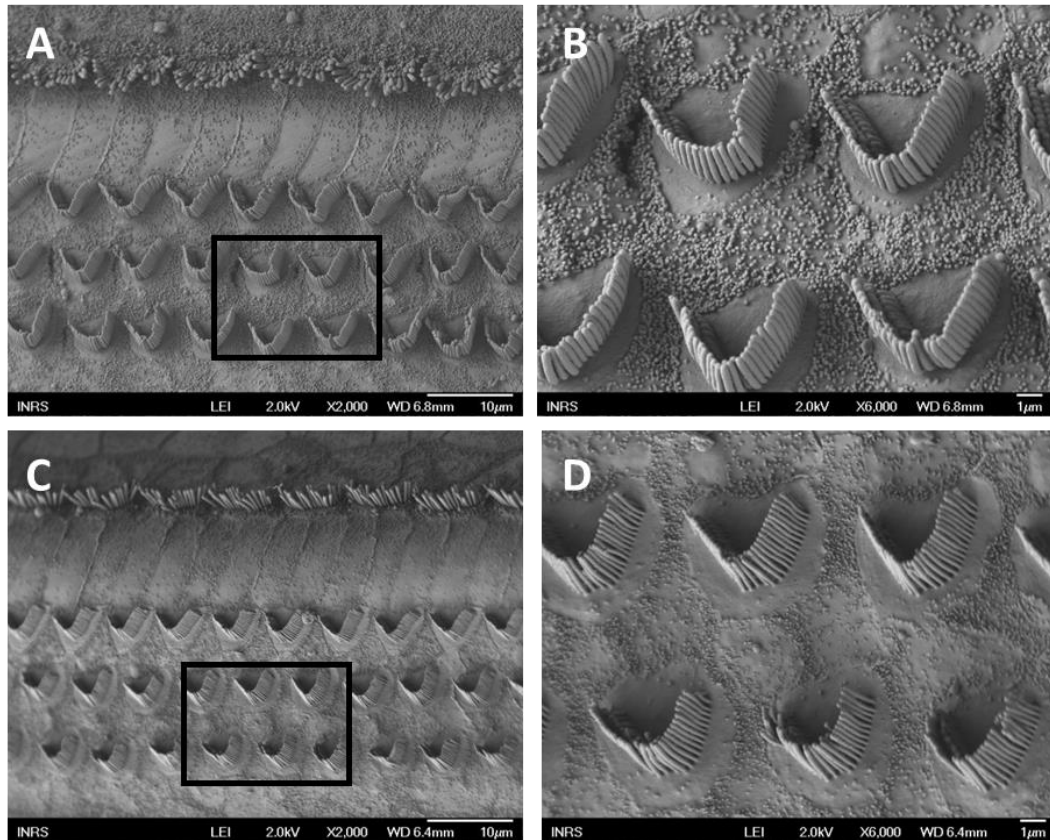
**Figura R9.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals control observats al final del període de recuperació. (A) Vista general de la còclea dissecada (X35). (B) Ampliació dels feixos ciliars intactes de les tres files de cèl·lules ciliades externes i la fila de cèl·lules ciliades internes a aproximadament 8 kHz (X1500). (C) Cèl·lula ciliada externa (X15000). (D) Cèl·lula ciliada interna (X10000).

L'exposició al soroll i/o a alguns solvents, pot produir danys mecànics sobre els estereocilis de manera reversible o, fins i tot permanent, depenent del grau de dany (Wang et al., 2002). Igualment, una exposició al soroll i/o als solvents condueix a la pèrdua de cèl·lules ciliades causada per la mort cel·lular.

Independentment del grup, no es va observar cap evidència de lesió a nivell dels estereocilis. Les mostres d'animals exposats al soroll sol (Fig. R10) o co-exposats (Fig. R11), eren similars a les mostres de control (Fig. R9). Aquestes dades demostren que ni el soroll de baixa freqüència ni la co-exposició de soroll amb CS<sub>2</sub> danya els estereocilis.



**Figura R10.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals exposats al soroll de baixes freqüències observats al final del període de recuperació. (A i C) Vista general de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis a aproximadament 14 i 8 kHz, respectivament (X2500). (B) Ampliació dels feixos ciliars intactes de les cèl·lules ciliades internes a aproximadament 14 kHz (X5000). (D) Cèl·lula ciliada externa (X16000).

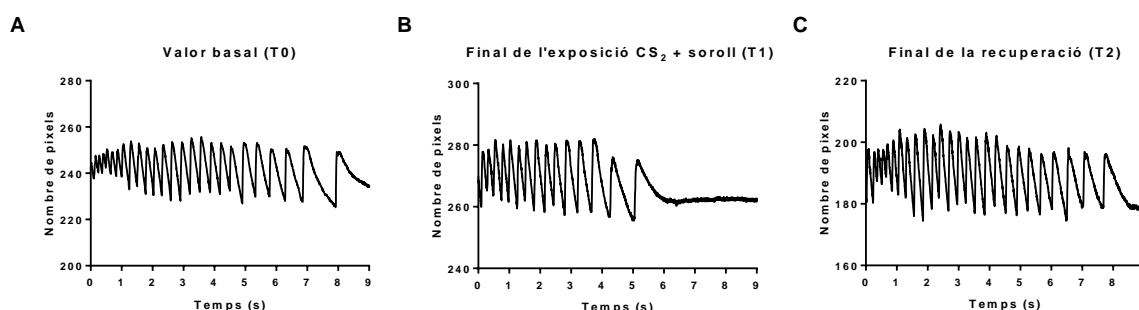


**Figura R11.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals exposats al soroll de baixes freqüències i 250 ppm de disulfur de carboni observats al final del període de recuperació. (A i C) Vista general de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis a aproximadament 12 i 9 kHz, respectivament (X2000). (B i D) Ampliació dels feixos ciliars intactes de les cèl·lules ciliades externes de la segona i tercera fila a aproximadament 12 i 9 kHz (X6000).

### 5.1.3 Efecte sobre el sistema vestibular

#### 5.1.3.1 Funció vestibular: nistagme post-rotatori

La Figura R12 il·lustra els traçats del NPR obtinguts en un mateix animal **co-exposat** al soroll i al CS<sub>2</sub> durant 4 setmanes, després d'una estimulació de 90°/s durant 40 s abans de l'exposició (Fig. R12A), després de l'exposició (Fig. R12B) i al final del període de recuperació (Fig. R12C).



**Figura R12.** Traçats del NPR enregistrats en un animal co-exposat després d'una estimulació a 90°/s durant 40 s en condicions basals (A), després de 4 setmanes d'exposició (B) i després del període de recuperació (C).

A la Figura R13 es poden veure els valors mitjans del nombre de sacades (A i C) i la durada total de les sacades (B i D) del NPR obtinguts en els diferents grups experimentals abans (T0), després de l'exposició (T1) i després del període de recuperació (T2) normalitzats a 100.

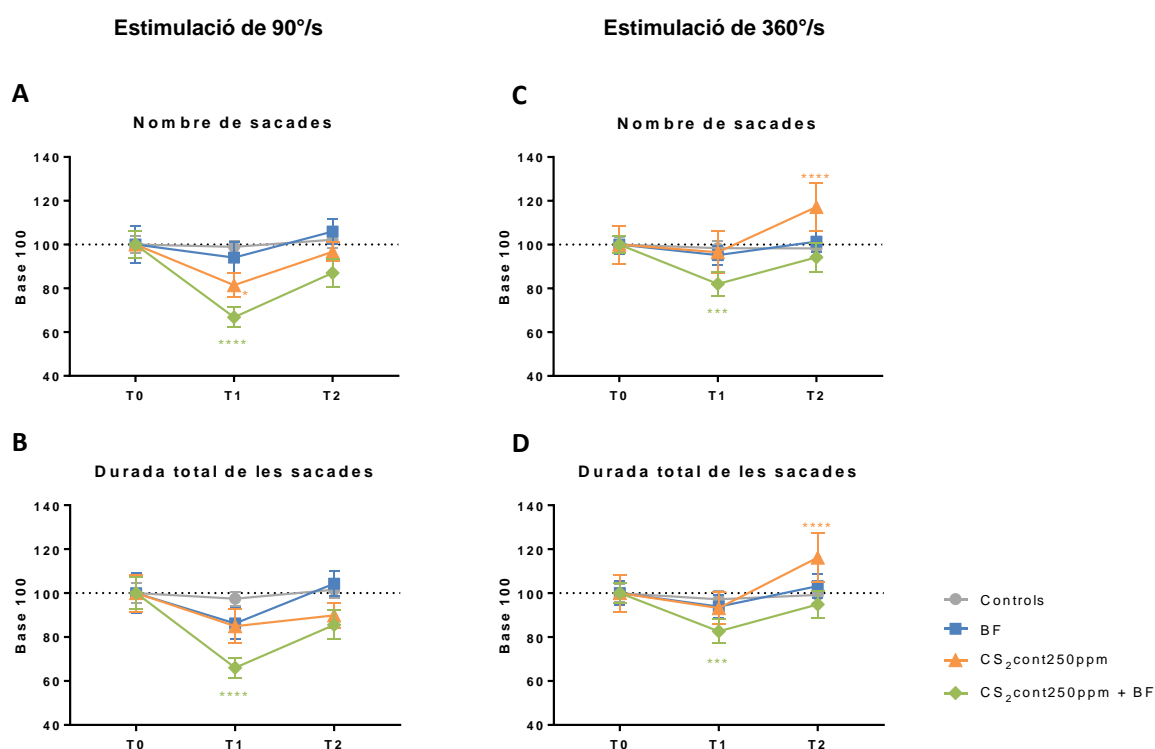
Després d'una **estimulació a 90°/s**, l'ANOVA de dos factors va revelar una interacció significativa “tractament” x “temps” pel nombre de sacades [ $F(6,138) = 4,45$ ;  $p = 0,0004$ ] i per la durada [ $F(6,140) = 3,33$ ;  $p = 0,0043$ ].

Al grup control i als animals exposats al soroll sol, ambdós paràmetres van romandre estables durant els tres punts temporals. Encara que l'exposició al CS<sub>2</sub> sol no va alterar significativament la durada de les sacades (Fig. R13B), va disminuir de manera significativa el nombre de sacades a T1 ( $p = 0,025$  vs. T0; Fig. R13A), però aquesta reducció es va recuperar a T2. Contràriament, la co-exposició del CS<sub>2</sub> i el soroll va induir a una reducció significativa del nombre de sacades (-33 %;  $p < 0,0001$ ) i de la durada (-34 %;  $p < 0,0001$ ) a T1. Aquestes dues mesures van tenir una recuperació parcial durant les 4 setmanes posteriors a l'exposició i no van presentar diferències significatives respecte als seus valors basals (nombre de sacades:  $p = 0,051$ ; durada de les sacades:  $p = 0,061$ ).



Pel que fa a les dades obtingudes després d'una **estimulació a 360°/s**, l'ANOVA de dos factors va revelar igualment una interacció significativa “tractament” x “temps” per ambdós paràmetres; el nombre de sacades [ $F(6,124) = 7,4$ ;  $p < 0,0001$ ] i la durada total [ $F(6,134) = 6,53$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. R13C-D).

En aquest cas, igual que passava amb la velocitat lenta, el grup control i el grup exposat al soroll sol es van mantenir estables durant tot l'experiment. No obstant, el grup exposat al solvent sol també mantenia la mitjana ambdós paràmetres constants després d'una estimulació a velocitat ràpida. A T2 aquest grup va presentar diferències significatives respecte els valors basals a causa de problemes no vinculats amb l'exposició al solvent (taques als ulls). Durant la cirurgia, els animals que formaven part de l'experiment al solvent sol, tant els exposats com controls, van patir una contaminació d'un producte irritant sobre els ulls que va provocar que, al llarg del temps, els hi apareguessin taques, la qual cosa va alterar els resultats d'aquest grup d'animals a T2. Finalment, igual que abans, després d'una estimulació a 360°/s en el grup co-exposat es va trobar una disminució significativa del nombre de sacades (-17 %;  $p < 0,0001$ ) i de la durada (-18 %;  $p < 0,0001$ ) a T1 amb una recuperació gairebé total després de les 4 setmanes (nombre de sacades:  $p = 0,166$ ; durada de les sacades:  $p = 0,204$ ).

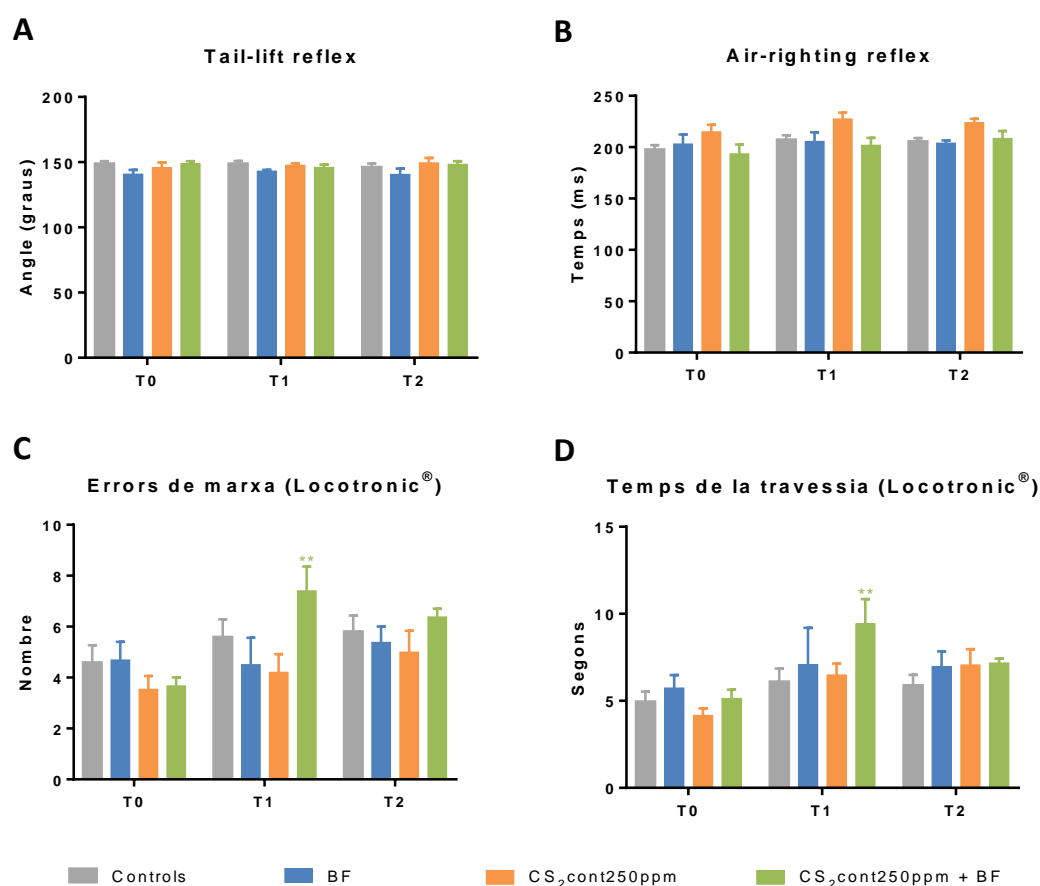


**Figura R13.** Nistagme post-rotatori. Nombre de sacades (A i C) i durada de les sacades (B i D) després d'una estimulació de 40 s a 90°/s (esquerre) o a 360°/s (dreta) mesurades per cada grup experimental a T0, T1 i T2 expressats com a percentatge respecte la línia de base. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , significativament diferents de la mitjana a T0, test de Bonferroni.

### 5.1.3.2 Comportament

La Figura R14 mostra els resultats de dos tests que avaluen la integritat de la funció vestibular; *tail-lift reflex* (Fig. R14A) i *air-righting reflex* (Fig. R14B). Cap dels grups experimentals va mostrar canvis significatius en cap de les mesures. Concretament, l'ANOVA no va revelar cap interacció significativa “tractament” x “temps” ni pel *tail-lift reflex* [ $F(6,44) = 0,62$ ;  $p = 0,7115$ ] ni pel *air-righting reflex* [ $F(6,76) = 0,42$ ;  $p = 0,8659$ ].

Paral·lelament es va realitzar el test **Locotronic®** per tal de quantificar els errors de marxa (Fig. R14C) i el temps total de la travessia (Fig. R14D). En aquest cas, tampoc trobem que la interacció “tractament” x “temps” vagi ser significativa en cap dels dos paràmetres analitzats, ni pels errors de marxa [ $F(6,78) = 0,93$ ;  $p = 0,4760$ ] ni pel temps de travessia [ $F(6,74) = 0,84$ ;  $p = 0,5405$ ]. Així i tot, pel que fa al grup co-exposat, trobem un augment significatiu d'ambdós paràmetres a T1 respecte el propi valor basal (T0) ( $p = 0,0091$  i  $p = 0,0065$ , respectivament). Encara que aquest test no sigui específic de la funció vestibular, pot donar una idea de l'equilibri de l'animal i el sistema locomotor.



**Figura R14.** Tests comporamentals. La funció vestibular es va avaluar a través de diversos tests abans (T0), al final de l'exposició (T1) i després de 4 setmanes de recuperació (T2). Test *tail-lift reflex* (A), test *air-righting reflex* (B), errors de la marxa (C) i temps de travessia (D). Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ , significativament diferents de la mitjana a T0, test de Bonferroni.

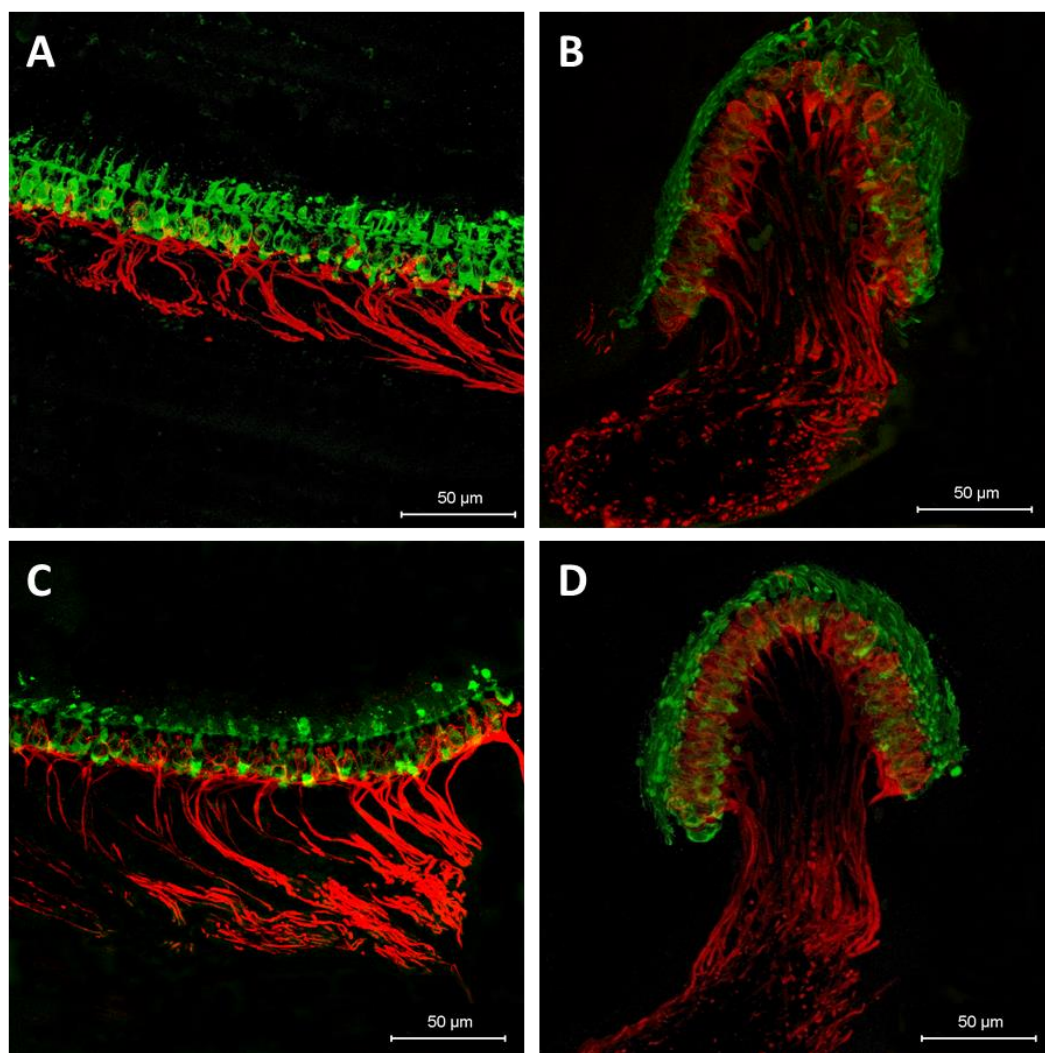
### **5.1.3.3 Anàlisis histològiques**

#### **5.1.3.3.1 Immunohistoquímica del vestíbul**

Com es va fer per l'òrgan auditiu, es va realitzar una IHQ dels epitelis vestibulars i es van observar per microscòpia de fluorescència confocal l'expressió de les fibres neuronals i les cèl·lules ciliades per tal d'evidenciar els efectes del CS<sub>2</sub> sobre aquests. Els anticossos utilitzats varen ser els mateixos que per la còclea, marcant doncs la subunitat pesada dels neurofilaments i la miosina VIIa que es troba a les cèl·lules ciliades.

Al final de l'exposició, tant els utricles com les crestes dels vestíbuls marcats va revelar característiques morfològiques similars en tots els animals controls (n = 9), exposats a 250 ppm de solvent sol (n = 3) i co-exposats a 250 ppm de CS<sub>2</sub> i soroll ric en baixes freqüències (n = 4), sense pèrdua evident de cèl·lules ni neurofilaments relacionada amb el tractament (Fig. R15).

Igual passa després de deixar els animals 4 setmanes en repòs, no es va observar cap diferència a les terminals nervioses entre els animals exposats al solvent sol (n = 3), els animals co-exposats (n = 3) i controls (n = 5). Per tant, la co-exposició a 250 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll no va causar efectes evidents en la distribució de les fibres aferents i en el contingut de neurofilaments, ja sigui al final de l'exposició o després que el període de recuperació.

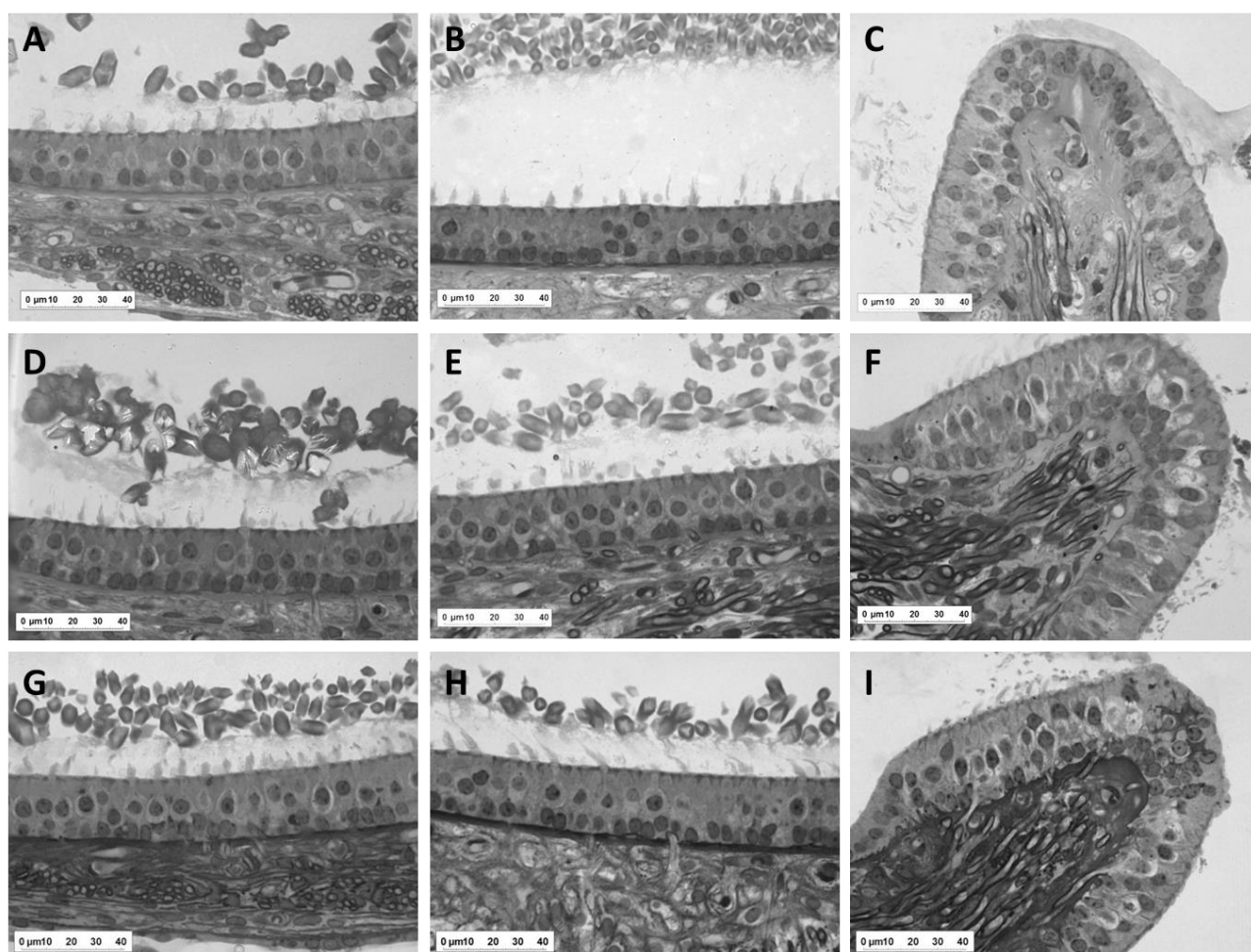


**Figura R15.** Imatges representatives d'alguns animals al final de les 4 setmanes d'exposició amb microscòpia òptica de fluorescència confocal del epiteli sensorial vestibular marcat amb anticòs anti-miosina VIIa (verd) i anti-neurofilament (vermell). El groc indica una superposició de les senyals vermells i verdes. (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni + soroll. Esquerra: Utricle. Dreta: Cresta.

### 5.1.3.3.2 Talls semi-fins dels epitelis vestibulars

Les observacions morfològiques dels epitelis sensorials vestibulars dels individus control s'ajustaven a les descrites a la literatura per rates adultes normals (Lysakowski and Goldberg, 1997; Seoane et al., 2001; Sousa et al., 2009; Wersäll and Bagger-Sjöbäck, 1974) (Fig. R16A-C).

Es va comparar la morfologia de l'epiteli sensorial vestibular, tant la màcula de l'utricle i del sàcul, com les crestes ampul·lars dels animals controls ( $n = 9$ ) i dels animals exposats al solvent, tant sol ( $n = 5$ ), com en co-exposició amb el soroll ( $n = 4$ ). Es va comprovar que tant els animals exposats a 250 ppm de CS<sub>2</sub> (Fig. R16D-F), com els co-exposats amb el soroll (Fig. R16G-I), no mostraven cap diferència en la integritat de l'epiteli sensorial respecte els animals control (Fig. R16A-C).

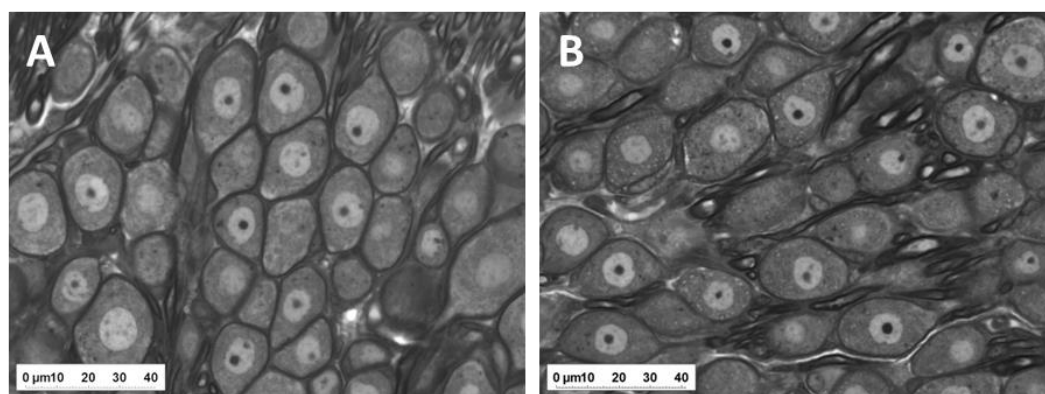


**Figura R16.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de l'epiteli sensorial vestibular observats al final de les 4 setmanes d'exposició. (A-C) Animal control. (D-F) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni. (G-I) Animal co-exposat a 250 ppm de disulfur de carboni i soroll. Esquerre: Utricle. Enmig: Sàcul. Dreta: Cresta.

### 5.1.3.3 Gangli de Scarpa

La Figura R17 il·lustra els resultats dels talls semi-fins dels ganglis vestibulars després del període de recuperació observats per microscòpia òptica per tal d'estudiar la morfologia dels cossos cel·lulars de les neurones ganglionars. Aquesta observació es va fer a animals exposats al solvent sol ( $n = 5$ ), co-exposats ( $n = 4$ ) i controls ( $n = 9$ ).

Podem comprovar que els ganglis dels animals exposats a 250 ppm de solvent (Fig. R17B) presentaven una morfologia similar als animals controls (Fig. R17A).



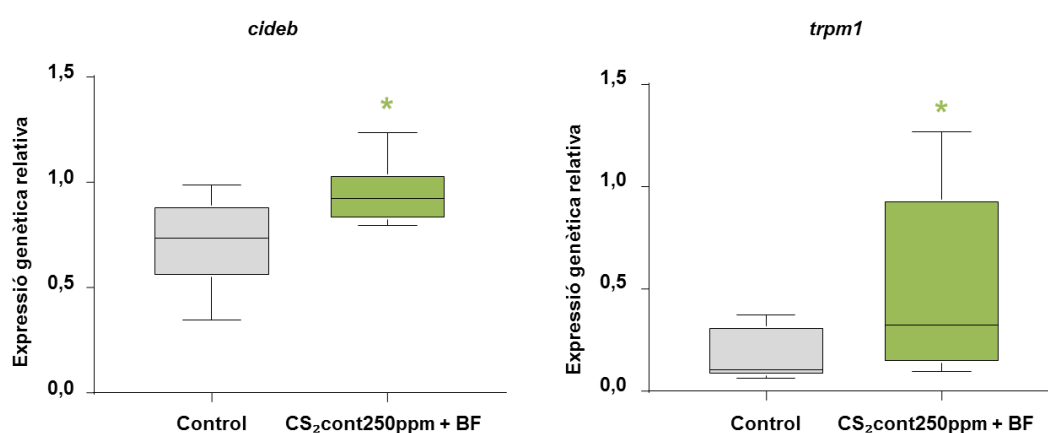
**Figura R17.** Microscòpia òptica de talls semi-fins del gangli de Scarpa al final del període de recuperació on s'observen els cossos cel·lulars de les neurones del gangli vestibular. (A) Animal control. (B) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni.

### 5.1.4 Efecte sobre el sistema nerviós central

Per tal d'examinar la toxicitat central de la co-exposició al CS<sub>2</sub> i al soroll, els nivells dels ARN d'un panell de 86 gens involucrats en mecanismes de neurotoxicitat van ser analitzats en el cerebel.

Els resultats de la qPCR d'alguns animals exposats a 250 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll en sortir de l'exposició, va posar en evidència que l'expressió gènica no es troba alterada de manera considerable. Dels 86 gens analitzats, sols el **Cideb** (*cell death-inducing DFFA-like effector B*), un gen pro-apoptòtic, i el **Trpm1** (*transient receptor potential cation channel subfamily M membre 1*), un canal catiònic permeable al calci, van trobar-se significativament sobre-expressats al cerebel ( $p = 0,0205$  i  $p = 0,0401$ , respectivament) (Fig. R18).

Així doncs, el CS<sub>2</sub> no va alterar de manera general l'expressió de marcadors de neurotoxicitat en el SNC.



**Figura R18.** Expressió genètica en el cerebel després de l'exposició a 250 ppm de disulfur de carboni i soroll. L'expressió de *cideb* i *trpm1* va ser analitzada per RT-qPCR. La  $\beta$ -actina, *Rpl13* i *Hprt* van ser utilitzats com a gens constitutius. Els resultats corresponen a la mediana [Q1; Q3] de 8 animals. \*  $p < 0,05$ , significativament diferents als controls, test de Mann-Whitney.

## **5.2. CAPÍTOL II:**

### **EFFECTE DOSIS-RESPOSTA DEL CS<sub>2</sub>**





Com s'ha observat en el capítol anterior, la co-exposició al soroll ric en baixes freqüències i a 250 ppm de CS<sub>2</sub> de manera contínua durant 6 h/dia causa un trastorn d'equilibri i d'audició.

En aquest apartat, es vol comprovar a partir de quina dosi de CS<sub>2</sub> juntament amb el soroll de baixes freqüències trobem un impacte sobre aquests sistemes, i si aquest solvent té un efecte dosi-resposta. Per això, es van analitzar les conseqüències de la co-exposició d'un soroll ric en baixes freqüències associat a tres concentracions de CS<sub>2</sub> (63, 250 i 500 ppm) sobre el sistema vestibular i el sistema auditiu. Igual que al capítol anterior, l'impacte sobre l'audició es mesura a través dels PDA i l'estat de l'equilibri s'analitza a través del NPR i l'estudi del comportament. Aquestes mesures es completen amb anàlisis histològiques dels receptors perifèrics. També s'analitza la concentració de TTCA en l'orina i els nivells circulants de CS<sub>2</sub> en sang de les rates després de l'exposició.

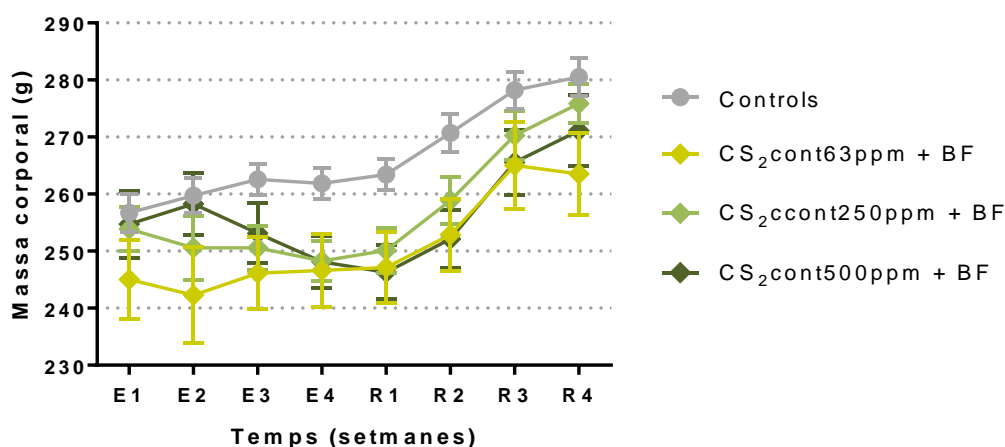
El protocol experimental (Fig. M1) i el nombre de rates (Taula M1) per aquesta part de l'estudi es troben a l'apartat de *Material i Mètodes*.

### 5.2.1 Salut general dels animals

Les rates van arribar a l'estabulari amb un pes d'entre 150 i 180 g, i passades 8 setmanes abans de començar les primeres mesures van assolir una mitjana de pes d'entre 220 i 285 g.

Durant l'**exposició**, els animals control (n = 18) i els animals exposats a 63 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll (n = 8) van mostrar un augment de pes, com es pot observar a la Figura R19, amb un guany de 5,2 g i 1,6 g, respectivament, entre T0 i T1. Contràriament, es va observar una pèrdua de pes dels animals exposats a 250 ppm (-4,4 g) (n = 7) i 500 ppm (-5,9 g) (n = 7) de solvent durant el període d'exposició. L'ANOVA de dos factors va confirmar diferències significatives per la interacció "tractament" x "temps" [F(9,114) = 3,27; p = 0,0014] durant l'exposició. D'acord amb el protocol estàndard definit per Morton and Griffiths, 1985 (Annex 1), els animals es trobaven en bona salut i no presentaven cap signe de patiment. No obstant, un animal exposat a 500 ppm de CS<sub>2</sub> van morir durant l'anestèsia en la sortida de l'exposició, abans de la mesura del PDA (T1).

Pel que fa al període de **recuperació**, es va observar un augment de pes en tots els grups d'animals, controls i exposats (Fig. R19). Els animals que havien tingut una major pèrdua de pes durant el període d'exposició o l'havien mantingut més o menys constant, van augmentar el pes corporal de manera significativa durant la recuperació, fent que al final de les 4 setmanes de recuperació (T2) la mitjana del pes corporal fos igual per tots els grups d'animals [F(3,36) = 2,42; p = 0,08].



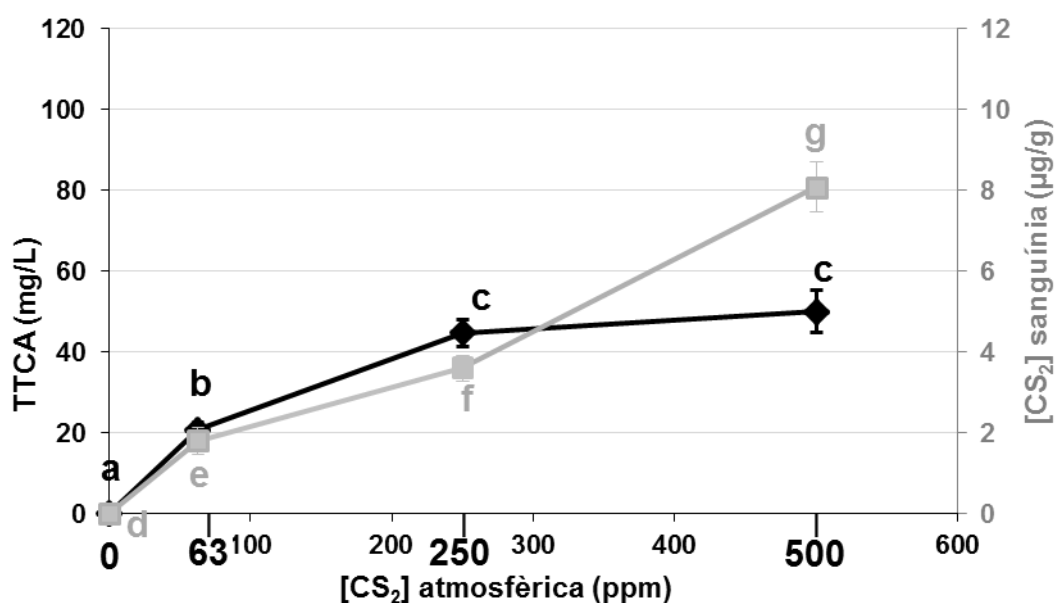
**Figura R19.** Evolució del pes corporal de les rates al llarg del període d'exposició (E) i el període de recuperació (R) per a tots els grups experimentals. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

## 5.2.2 Metabolisme

### 5.2.2.1 Concentració de CS<sub>2</sub>: atmosfèrica vs. sanguínia

La relació entre la concentració de CS<sub>2</sub> atmosfèrica i sanguínia mesurada al final de l'exposició es troba representada a la Figura R20.

Una notable diferència significativa es va obtenir entre els grups [ $F(3,41) = 121,78$ ;  $p < 0,001$ ]: 63 ppm de CS<sub>2</sub> ( $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ), 250 ppm de CS<sub>2</sub> ( $3,6 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ) i 500 ppm de CS<sub>2</sub> ( $8,1 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ ). Com era d'esperar, totes les mostres de les rates control tenien concentracions de CS<sub>2</sub> sanguini per sota del límit de detecció. El test de Bonferroni va indicar una diferència significativa entre cada un dels grups. Lògicament, la concentració sanguínia de CS<sub>2</sub> va augmentar en funció de l'augment de les concentracions atmosfèriques.



**Figura R20.** Relació entre la concentració atmosfèrica de CS<sub>2</sub> (ppm) i la concentració sanguínia de CS<sub>2</sub> o urinària de TTCA. Ordenada dreta: concentració de CS<sub>2</sub> sanguínia (μg/g); ordenada esquerra: concentració urinària de TTCA (mg/L). TTCA: àcid 2-thioxotiazolina-4-carboxílic. Els valors corresponen a la mitjana ± SEM ( $n = 8/\text{grup}$ ). Les diferències estadístiques obtingudes mitjançant el test de Bonferroni es troben representades per lletres. Els grups amb la mateixa lletra no són significativament diferents, el contrari passa amb els grups amb lletres diferents. a, b, c: TTCA. d, e, f, g: càrrega sanguínia de CS<sub>2</sub>.

### **5.2.2.2 Concentració de CS<sub>2</sub> atmosfèrica vs. concentració de TTCA urinària**

La Figura R20 també mostra la relació entre el principal metabòlit urinari, el TTCA, i les pertinents concentracions atmosfèriques de CS<sub>2</sub>. Les mostres corresponen a l'orina excretada durant un període de 18 h posterior a l'exposició.

Es va observar una diferència estadísticament significativa entre els grups [ $F(3,41) = 90,63$ ;  $p < 0,001$ ]. Es va trobar una diferència significativa entre les rates exposades a 63 ppm de CS<sub>2</sub> ( $20,8 \pm 1,9$  mg/l) i les rates exposades a dosis més altes. Contràriament, no es va trobar cap diferència significativa entre el grup d'animals exposats a 250 ppm ( $44,7 \pm 3,2$  mg/l) i el grup exposat a 500 ppm ( $50 \pm 5,2$  mg/l).

L'augment de la concentració de TTCA entre 250 i 500 ppm de CS<sub>2</sub> era només del 12 %, mentre que la concentració atmosfèrica de CS<sub>2</sub> es duplicava. En canvi, l'augment de la concentració de TTCA entre 63 i 250 ppm de CS<sub>2</sub>, és a dir, una concentració de CS<sub>2</sub> atmosfèrica 4 vegades superior, va ser de 115 %.

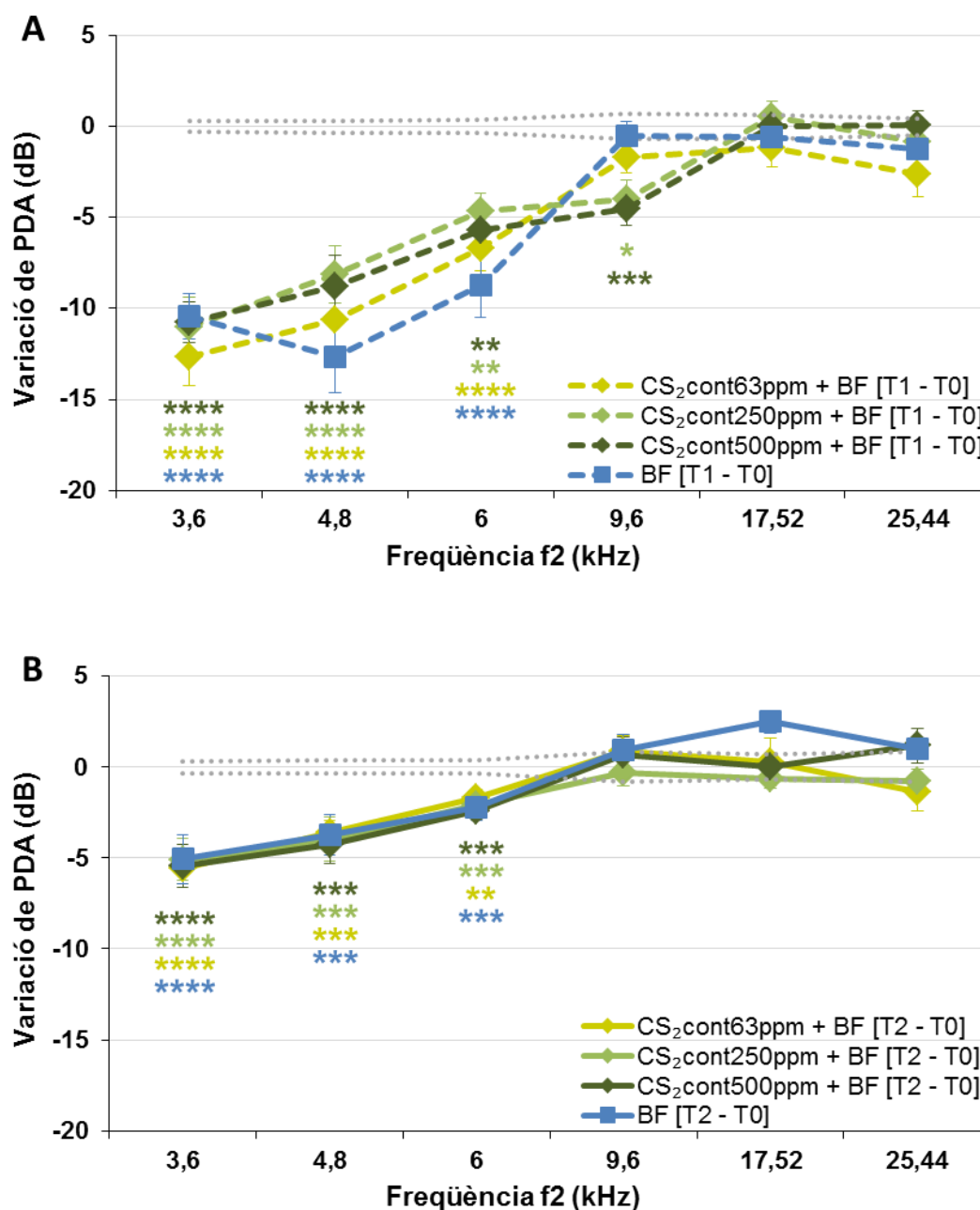
## 5.2.3 Efecte sobre el sistema auditiu

### 5.2.3.1 Funció auditiva: productes de distorsió acústics

Com s'ha dit al capítol anterior, el soroll va generar pèrdues auditives per a les freqüències de 3,6 a 6 kHz. La màxima pèrdua auditiva al finalitzar l'exposició era del voltant de 13 dB a 4,8 kHz (Fig. R21A). Després de la recuperació, les pèrdues sols eren de 5,4 i de 4,3 dB a les freqüències de 3,6 i 4,8 kHz, respectivament (Fig. R21B).

Els experiments realitzats amb les diferents concentracions de solvent (0, 63, 250 i 500 ppm) juntament amb soroll, van mostrar que al final de l'**exposició** la gamma de freqüències alterada s'allargava fins a 9,6 kHz quan la concentració de CS<sub>2</sub> era igual o superior a 250 ppm (Fig. R21A). A 63 ppm de CS<sub>2</sub>, el valor de l'amplitud del PDA a 9,6 kHz era inferior al del grup control, però la diferència no era significativa ( $p = 0,1213$ ). A partir de 250 ppm aquesta pèrdua va esdevenir significativa i aquest efecte encara era més remarcable a la concentració de 500 ppm com es mostra a la Taula R1. Els desplaçaments d'amplitud mesurats a 4,8 i 6 kHz, encara que van ser lleugerament inferiors en animals co-exposats respecte als animals de soroll sol, no van assolir diferències significatives.

Després de les 4 setmanes de **recuperació**, per a tots els grups co-exposats, la gamma de freqüències amb una variació de l'amplitud significativa era idèntica a l'obtinguda en l'exposició al soroll sol; de 3,6 a 6 kHz. Per tant, l'ampliació de la finestra de freqüències danyades provocada pel CS<sub>2</sub> a T1 va ser transitòria en ambdues concentracions (250 i 500 ppm).



**Figura R21.** Variacions dels PDA dels diferents grups experimentals. (A) Variacions dels PDA al final del període d'exposició:  $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposats} - [PDA1 - PDA0]_{Controls}$ . (B) Variacions dels PDA al final del període de recuperació:  $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposats} - [PDA2 - PDA0]_{Controls}$ . BF: soroll ric en baixes freqüències. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. La línia de punts representa la variabilitat del grup control (SEM). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , significativament diferent a la mitjana dels controls, test de Bonferroni.

La Taula R1 indica, per a cada grup d'exposició i per a cada freqüència, les pèrdues auditives i la significació de l'efecte respecte el grup control a la sortida de l'exposició (T1) i després de 4 setmanes de recuperació (T2).

PDA f2 (kHz)	Mesura	BF	CS <sub>2</sub> cont63ppm + BF	CS <sub>2</sub> cont250ppm + BF	CS <sub>2</sub> cont500ppm + BF
3,6	[T1 – T0] *	-10,4	-12,7	-11	-10,8
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	[T2 – T0]	-5,1	-5,6	-5,1	-5,4
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4,8	[T1 – T0]	-12,6	-10,6	-8,1	-8,8
	p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	[T2 – T0]	-3,7	-3,6	-4	-4,2
	p	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001
6	[T1 – T0]	-8,7	-6,7	-4,6	-5,7
	p	0,0000	0,0000	0,0033	0,0011
	[T2 – T0]	-2,2	-1,7	-2,1	-2,4
	p	0,0006	0,0028	0,0008	0,0002
9,6	[T1 – T0]	-0,5	-1,7	-4	-4,6
	p	0,7518	0,1213	0,0115	0,0007
	[T2 – T0]	0,9	0,9	-0,3	0,7
	p	0,9710	0,4369	0,8127	0,6091
17,52	[T1 – T0]	-0,5	-1,1	0,6	0
	p	0,8939	0,5188	0,6202	0,8719
	[T2 – T0]	2,5	0,3	-0,7	0
	p	0,2772	0,6607	0,3160	0,8837
25,44	[T1 – T0]	-1,2	-2,6	-0,8	0,1
	p	0,2281	0,0634	0,4767	0,9973
	[T2 – T0]	1	-1,4	-0,8	1,2
	p	0,2672	0,2150	0,4268	0,3319

**Taula R1.** Variacions dels PDA (amplitud, en dB) obtingut en tots els grups exposats al final de l'exposició ( $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposats} - [PDA1 - PDA0]_{Controls}$ ) o al final del període de recuperació ( $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposats} - [PDA2 - PDA0]_{Controls}$ ). P: probabilitat entre grups (exposat vs. control), en vermell quan la diferència és estadísticament significativa ( $p < 0,05$ ). \* Càlcul amb els valors censurats a través del model "Tobit".

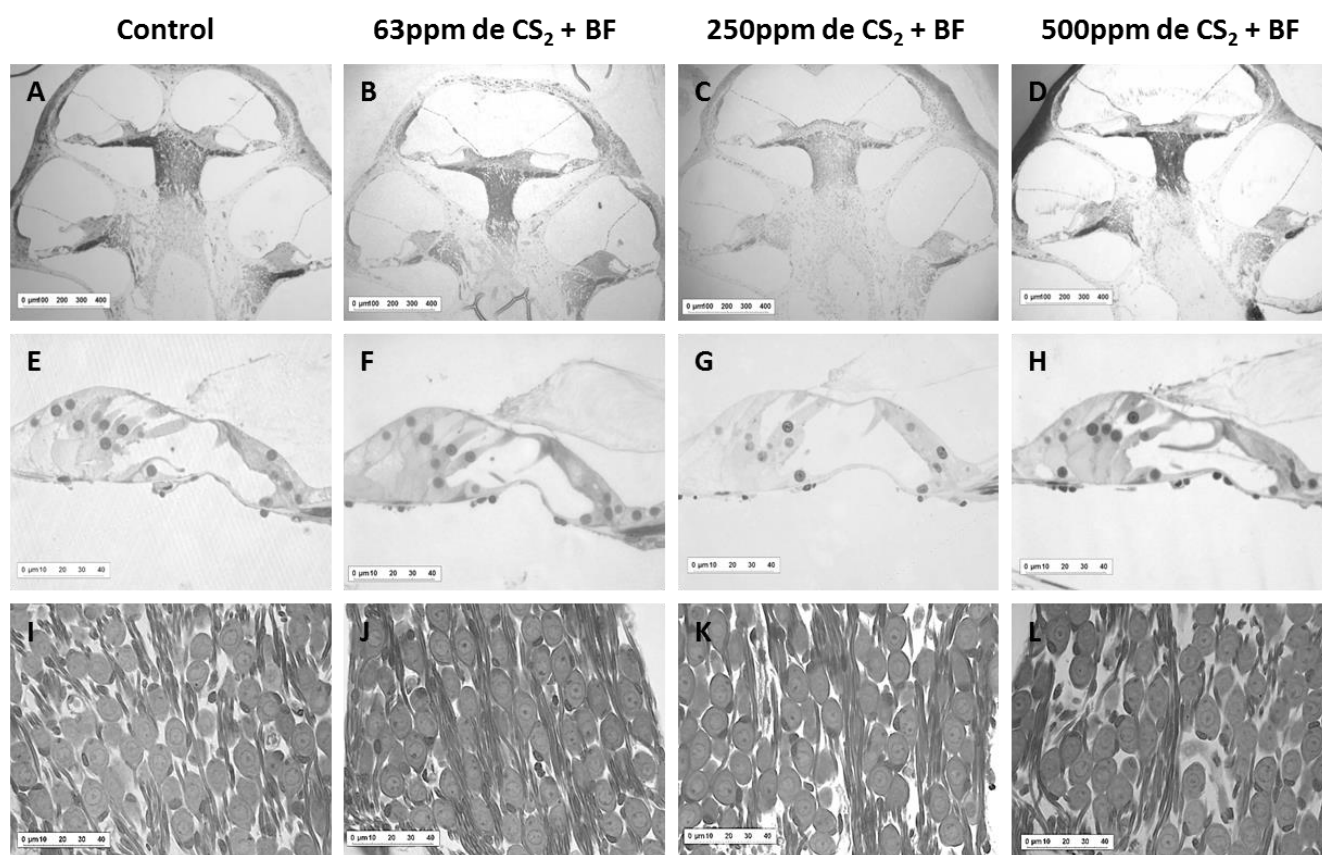


### 5.2.3.2 Anàlisis histològiques

#### 5.2.3.2.1 Talls semi-fins de la còclea (òrgan de Corti + gangli espiral)

Les característiques morfològiques del les còclees dels animals controls i exposats a diferents dosis després de 4 setmanes de recuperació, es van observar a través del microscopi òptic.

L'estructura de tots els animals examinats (n = 4/grup) va ser similar a la descrita en la literatura per a les rates de control adultes (Fig. R22). Es van analitzar uns 25-30 talls de cada còclea inclosa, on es va observar l'òrgan de Corti, tant de la part basal, com mitja, com de la part apical, i els ganglis espirals. Totes les còclees van presentar una morfologia normal, amb una CCI i tres CCE en cada tall dels òrgans de Corti i els cossos cel·lulars de les neurones del gangli espiral apical no presentaven aspecte patològic. Per tant, la morfologia general de les còclees es va mantenir intacta, independentment de l'exposició.

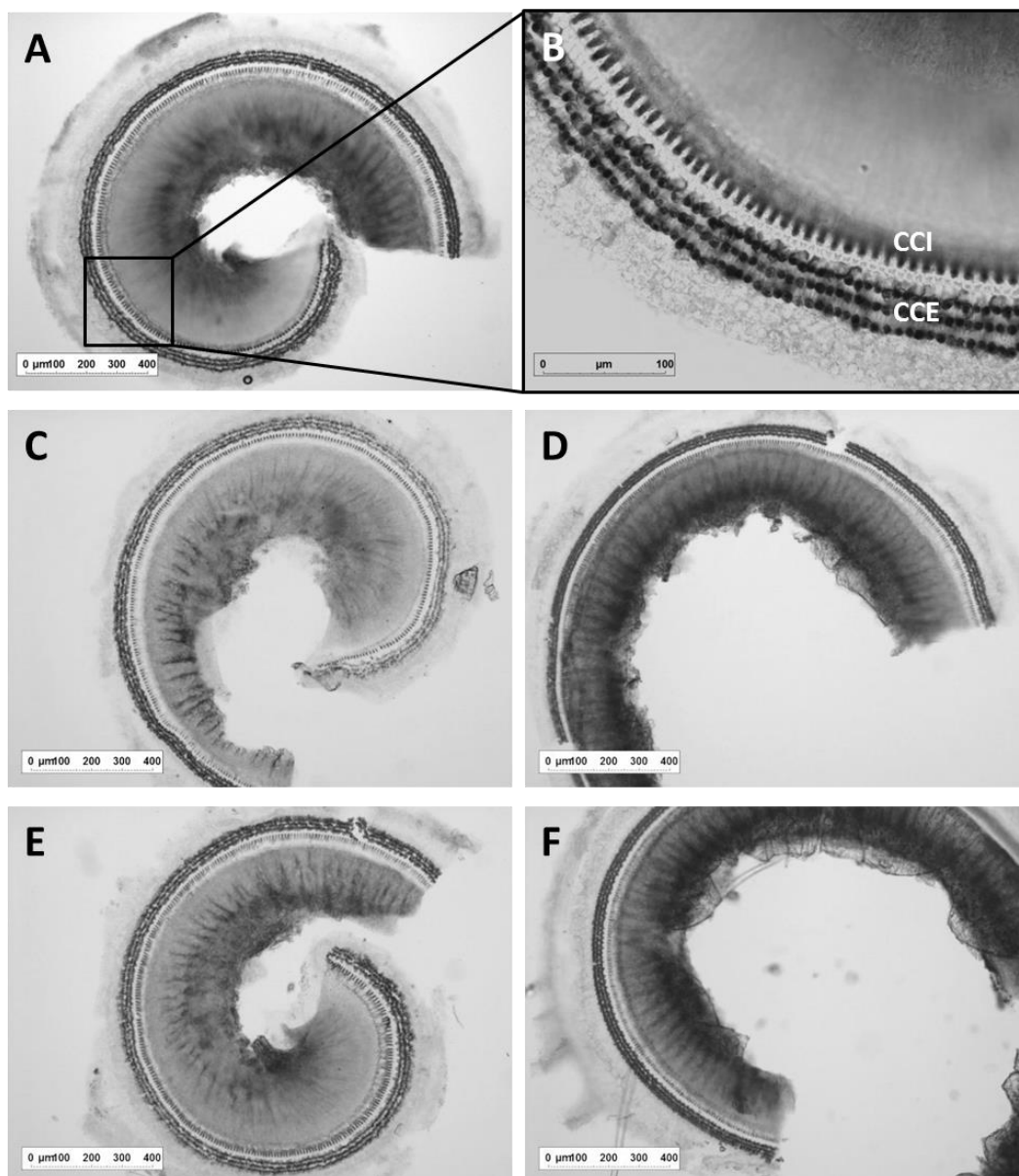


**Figura R22.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea observats al final de les 4 setmanes de recuperació. Exemples d'imatges d'animals exposats a les diferents condicions experimentals. (A-D) Còclea. (E-H) Òrgan de Corti amb les tres cèl·lules ciliades externes i una cèl·lula ciliada interna, amb la membrana tectorial unida als estereocilis. (I-J) Cossos cel·lulars de neurones ganglionars del gangli apical.

### 5.2.3.2.2 Cocleograma

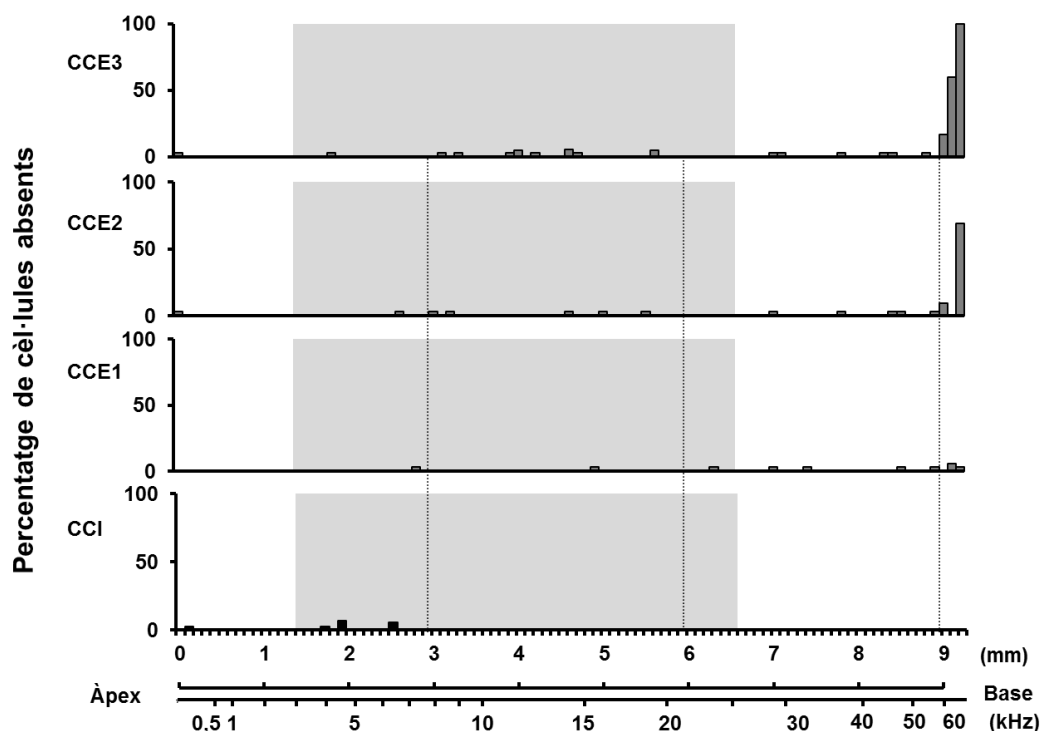
Igualment, després del període de recuperació es va fer el recompte de les cèl·lules ciliades a través del microscopi òptic per calcular el percentatge de cèl·lules absents.

En tots els grups, tant dels animals controls com exposats, es van observar molt poques cèl·lules ciliades absents, el percentatge d'absències era sols d'entre un 1-2% (Fig. R23)



**Figura R23.** Microscòpia òptica de l'òrgan de Corti amb les cèl·lules ciliades marcades amb succinat de sodi i nitroblau de tetrazolium. (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 250 ppm de disulfur de carboni + soroll. (E-F) Animal exposat a 500 ppm de disulfur de carboni + soroll. Esquerra: Volta apical de l'òrgan de Corti. (B) Ampliació on es poden apreciar les tres files de cèl·lules ciliades externes (CCE) i la fila de cèl·lules ciliades internes (CCI). (D i F) Volta mitjana de l'òrgan de Corti.

Encara que la mesura dels PDA va mostrar una pèrdua auditiva significativa en tots els grups co-exposats entre 3,6 i 6 kHz, no hi va haver pèrdua cel·lular evident. La Figura R24 mostra el cocleograma obtingut a partir de la mitjana de 4 rates exposades a soroll continu de baixa freqüència + 500 ppm de CS<sub>2</sub>, el qual és similar al del grup control, el co-exposat a 63 ppm i el co-exposat a 250 ppm.

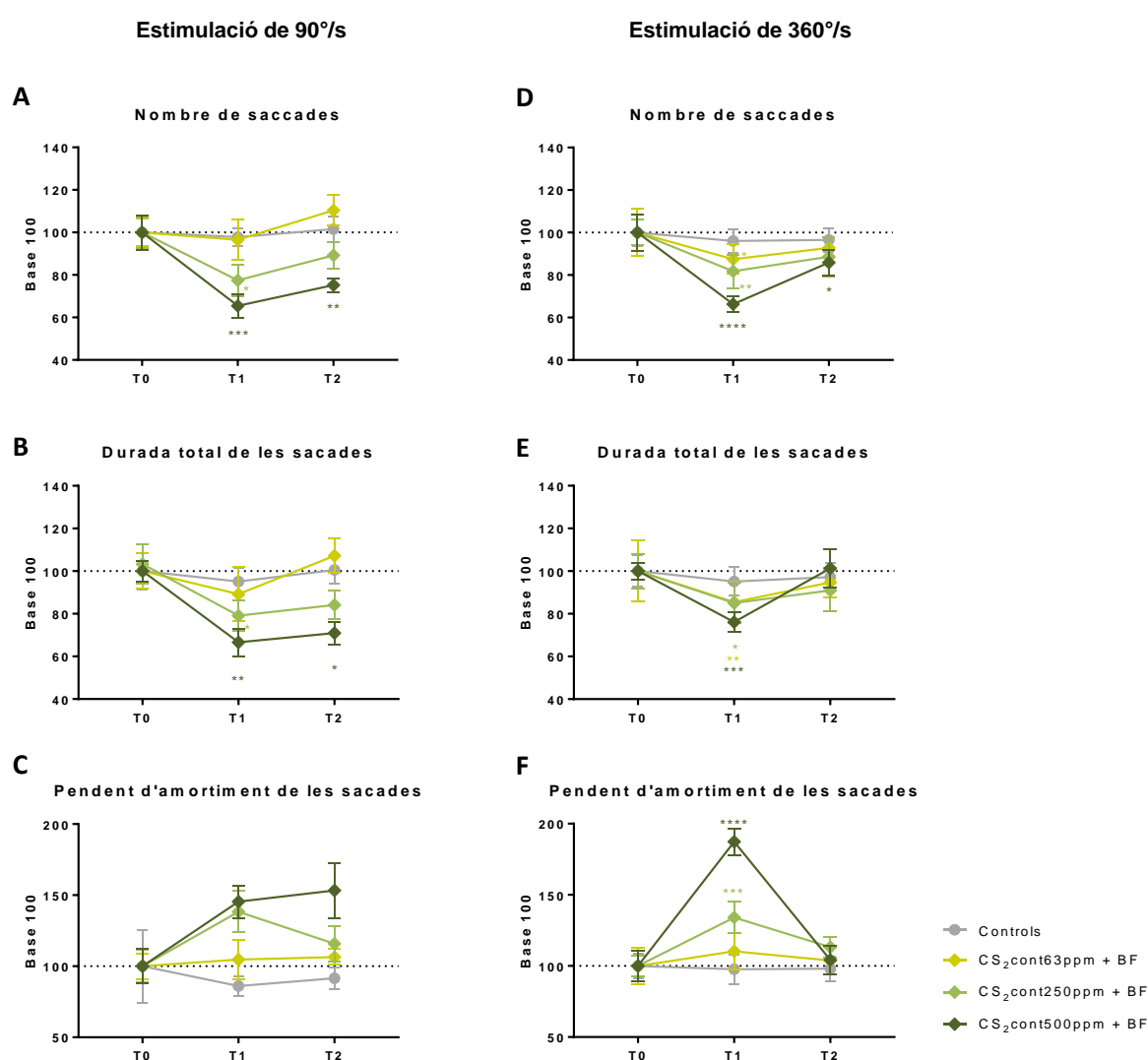


**Figura R24.** Mitjana dels cocleograms ( $n = 4$ ) de rates exposades durant 4 setmanes a 500 ppm de CS<sub>2</sub> + soroll al final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.

## 5.2.4 Efecte sobre el sistema vestibular

### 5.2.4.1 Funció vestibular: nistagme post-rotatori

La Figura R25 representa els valors mitjans dels tres paràmetres analitzats de l'enregistrament del NPR: nombre de sacades (A i D), durada total de les sacades (B i E) i pendent d'amortiment de les sacades (C i F), obtinguts en els diferents grups experimentals abans de l'exposició (T0), després de l'exposició (T1) i després del període de recuperació (T2).



**Figura R25.** Nistagme post-rotatori. Nombre de sacades (A i D), durada de les sacades (B i E) i pendent d'amortiment de les sacades (C i F) després d'una estimulació de 40 s a 90°/s (esquerra) o a 360°/s (dreta) mesurades per cada grup experimental a T0, T1 i T2 expressats com a percentatge respecte la línia de base. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , significativament diferents de la mitjana a T0, test de Bonferroni.

Després d'una **estimulació a 90°/s**, l'ANOVA de dos factors va revelar una interacció significativa “tractament” x “temps” pel nombre de sacades [ $F(6,58) = 2,98$ ;  $p = 0,0133$ ] (Fig. R25A). Pel que fa a la durada, es va observar un efecte marginalment significatiu [ $F(6,60) = 2,02$ ;  $p = 0,0765$ ], mentre que la pendent d'amortiment de les sacades no va assolir canvis estadísticament significatius [ $F(6,58) = 1,25$ ;  $p = 0,2929$ ] (Fig. R25B-C).

La co-exposició al soroll i a 63 ppm de CS<sub>2</sub> no va generar cap modificació significativa en cap dels paràmetres analitzats respecte els seus valors basals. Aquestes mateixes mesures realitzades als animals control també van romandre estables al llarg de tot l'experiment. Com s'ha descrit ja en el capítol anterior, la co-exposició amb 250 ppm de solvent va provocar una disminució significativa del nombre de sacades (-23 %;  $p = 0,0163$ ) i de la durada (-24 %;  $p = 0,0402$ ) a T1, però no va provocar cap canvi de la pendent d'amortiment de les sacades ( $p = 0,2467$ ). Ambdós paràmetres van tenir una evident recuperació al final de les 4 setmanes de recuperació fent que no presentessin diferències significatives respecte els seus valors a T0 en la co-exposició a 250 ppm de solvent (nombre de sacades:  $p = 0,3902$ ; durada de les sacades:  $p = 0,1249$ ). Un efecte similar es va observar a T1 en els animals co-exposats al soroll i 500 ppm de CS<sub>2</sub>, els quals van presentar una disminució significativa del nombre de sacades (-35 %;  $p = 0,0002$ ) i de la durada (-33 %;  $p = 0,0033$ ). A aquesta dosi, però, tant el nombre de sacades (-25 %,  $p = 0,0077$ ), com la durada d'aquestes (-29 %,  $p = 0,0113$ ) a T2 van persistir significativament diferents de T0.

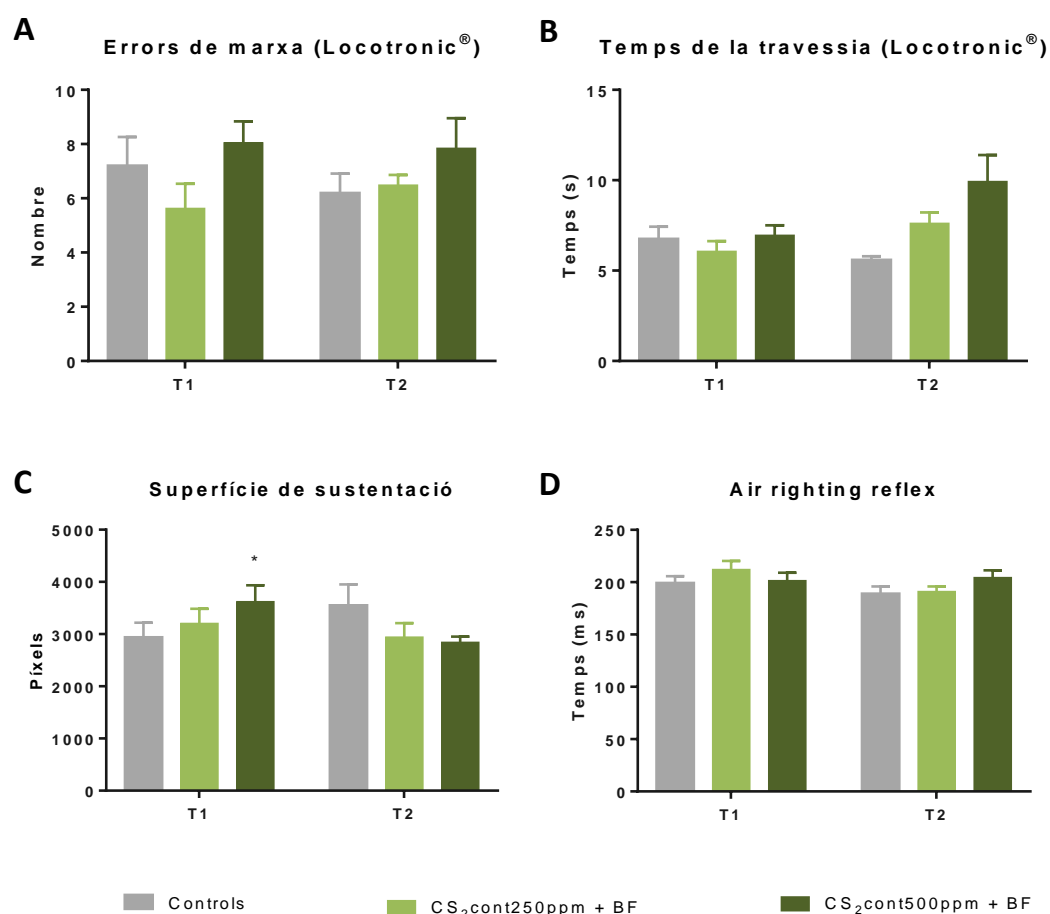
Pel que fa a les dades obtingudes després d'una **estimulació a 360°/s**, l'ANOVA de dos factors va revelar una interacció significativa “tractament” x “temps” pels tres paràmetres analitzats; nombre [ $F(6,62) = 3,5$ ;  $p = 0,0048$ ], durada [ $F(6,62) = 2,6$ ;  $p = 0,0262$ ] i pendent d'amortiment de les sacades [ $F(6,62) = 17,92$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. R13D-F).

En aquest cas, sols el grup control mantenir estable els tres paràmetres al llarg de tot l'experiment. El grup exposat a 63 ppm de solvent va presentar una disminució significativa en el nombre de sacades (-13 %;  $p = 0,0277$ ) i en la durada total (-15 %;  $p = 0,0076$ ) a T1 respecte T0, però va tenir una recuperació total a T2. Finalment, després d'una estimulació a 360°/s tant el grup co-exposat a 250 ppm com a 500 ppm de CS<sub>2</sub> es va trobar una disminució significativa del nombre de sacades (-18 %;  $p = 0,0044$  i -34 %;  $p < 0,0001$ , respectivament) i de la durada (-15 %;  $p < 0,0185$  i -24 %;  $p = 0,0001$ , respectivament), i un augment significatiu de la pendent d'amortiment (34 %;  $p = 0,0003$  i 87 %;  $p < 0,0001$ , respectivament) a T1, amb una recuperació gairebé total després de les 4 setmanes per ambdós grups, menys pel nombre de sacades en el grup co-exposat a 500 ppm ( $p = 0,0321$ ).

### 5.2.4.2 Comportament

Al test **Locotronic®**, com es pot observar a la Figura R26A-B, la interacció “tractament” x “temps” no va ser significativa ni pels errors de marxa [ $F(2,19) = 0,48$ ;  $p = 0,6236$ ] ni pel temps de travessia [ $F(2,19) = 3,47$ ;  $p = 0,0518$ ]. A més, no trobem cap diferència significativa entre els valors a la sortida de l'exposició (T1) ni 4 setmanes després (T2) per cap dels grups mesurats.

En canvi, la **superfície de sustentació**, és a dir, la superfície del quadrilàter que creen les potes dels animals abans de començar a caminar, va presentar una interacció “tractament” x “temps” significativa [ $F(2,19) = 7,54$ ;  $p = 0,0039$ ]. Els animals exposats a 500 ppm de CS<sub>2</sub> mostrava una disminució significativa d'aquesta superfície al final de la recuperació respecte el valor de després les 4 setmanes d'exposició ( $p = 0,026$ ; Fig. R26C). Finalment, el test **air-righting reflex** tampoc va revelar cap interacció significativa “tractament” x “temps” [ $F(2,18) = 1,99$ ;  $p = 0,1651$ ] (Fig. R26D).



**Figura R26.** Tests comportamentals. La funció vestibular es va avaluar a través de diversos tests abans (T0), al final de l'exposició (T1) i després de 4 setmanes de recuperació (T2). Errors de la marxa (A), temps de travessia (B), superfície de sustentació (C) i air-righting reflex (D). Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , significativament diferents de la mitjana a T2, test de Bonferroni.

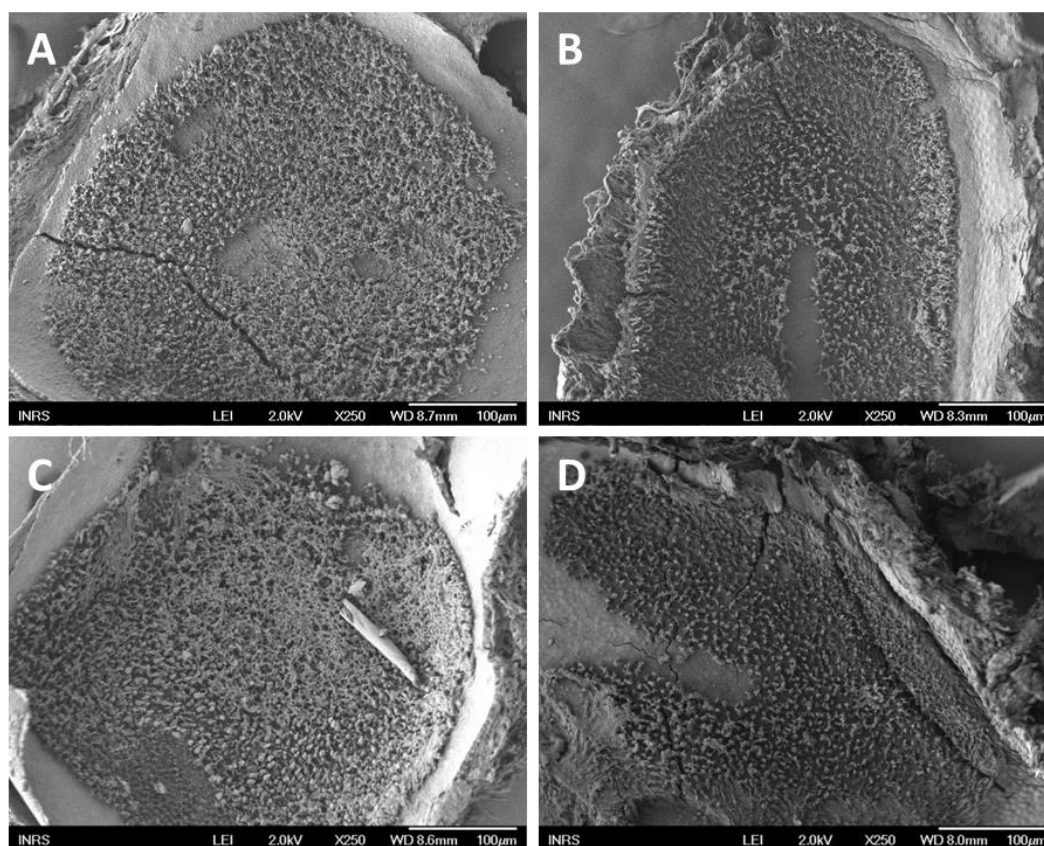
### **5.2.4.3 Anàlisis histològiques**

#### **5.2.4.3.1 MER del vestíbul**

Es va observar la superfície de les mostres d'utrícles i sàculs per microscòpia electrònica de rastreig (n = 4/grup) després del període de recuperació per tal de comprovar l'estat de les cèl·lules i els feixos ciliars.

La intoxicació d'alguns solvents o altres productes químics pot provocar pèrdua de cèl·lules ciliades per extrusió, necrosis o apoptosis segons el curs temporal de la intoxicació (Seoane et al., 2001; Seoane and Llorens, 2005). Una de les característiques patològiques més comuns és l'aparició d'ampolles a la superfície dels epitelis vestibulars com a conseqüència d'un estrès d'aquestes cèl·lules vestibulars o com un artefacte de la preparació (Goodyear et al., 2008; Shi et al., 2005). En models d'intoxicació crònica, la coalescència dels estereocilis i l'extrusió de les cèl·lules ciliades està associat amb un pronòstic pobre de recuperació funcional, suggerint així que aquestes característiques poden ser els punts de no retorn en rates adultes (Sedo-Cabazon et al., 2015). Passat aquest punt, es produeix una pèrdua irreversible de cèl·lules ciliades, amb una inevitable pèrdua de funció permanent.

Els utrícles i els sàculs de les mostres dels animals controls (Fig. R27A-B) i exposats a 500 ppm de CS<sub>2</sub> juntament amb soroll (Fig. R27C-D), van mostrar una densitat de feixos ciliars similars a les descrites en la literatura per les rates adultes normals (Dechesne et al., 1986; Hunter-Duvar, 1983; Llorens et al., 1993b). La conclusió que se'n pot derivar d'aquestes observacions és que la pèrdua de funció observada amb les mesures del nistagme en el cas de la co-exposició, no està associada a processos de pèrdua cel·lular.



**Figura R27.** Microscòpia electrònica de rastreig del vestibul observats al final del període de recuperació (X250). (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 500 ppm de disulfur de carboni + soroll. Esquerre: Utricle. Dreta: Sàcul.





### **5.3. CAPÍTOL III:**

### **EXPOSICIÓ AL CS<sub>2</sub>: CONTÍNUA VS.**

### **INTERMITENT**



Es sap que el CS<sub>2</sub> és ràpidament absorbit i és distribuït a tot el cos a través de la sang. A causa de la seva naturalesa lipòfila s'uneix fàcilment a òrgans amb alt contingut de greix com el cervell i el fetge, on és metabolitzat.

Es pot pensar que el patró d'exposició al solvent (exposició de manera contínua o de manera intermitent) pot tenir una major influència sobre l'efecte tòxic final que la dosi final administrada. A la sang, el nivell de CS<sub>2</sub> augmenta de manera exponencial durant els primers 90 min d'exposició i després es manté constant. Una vegada la intoxicació acaba, el nivell de CS<sub>2</sub> lliure disminueix ràpidament; el 40 % es perd durant els primers 6 min i la seva completa eliminació es fa entre 5-7 hores; no obstant això, el nivell de CS<sub>2</sub> unit en els teixits continua augmentant després d'acabar l'exposició (McKenna and DiStefano, 1977a, 1977b). Així doncs, una exposició contínua podria no tenir el mateix efecte que una exposició intermitent, encara que la dosi final administrada al final del dia fos la mateixa.

Per aquest motiu, la finalitat principal d'aquesta part del projecte és estudiar l'impacte sobre l'audició i l'equilibri de l'exposició al CS<sub>2</sub> en diferents patrons temporals, per tal de analitzar, per una banda, si una dosi final equivalent de CS<sub>2</sub> té el mateix impacte quan aquesta es dona de manera contínua (63 ppm de CS<sub>2</sub> 6 h/dia) o de manera intermitent (250 ppm de CS<sub>2</sub> 15 min/h) i, per altra banda, en quin moment els efectes d'una exposició intermitent esdevenen similars als de l'exposició contínua per una mateixa concentració de solvent (250 ppm de CS<sub>2</sub> 15 min cada hora o 15 min cada mitja hora, o de manera contínua durant 6 hores al dia). Com abans, l'impacte sobre l'audició es mesura a través dels PDA i l'estat de l'equilibri s'analitza a través del RVO i el comportament. Aquestes mesures es completen amb anàlisis histològiques dels receptors perifèrics. Igualment, es va analitzar la concentració del TTCA en l'orina de les rates i la concentració del CS<sub>2</sub> en sang i en cervell després de l'exposició.

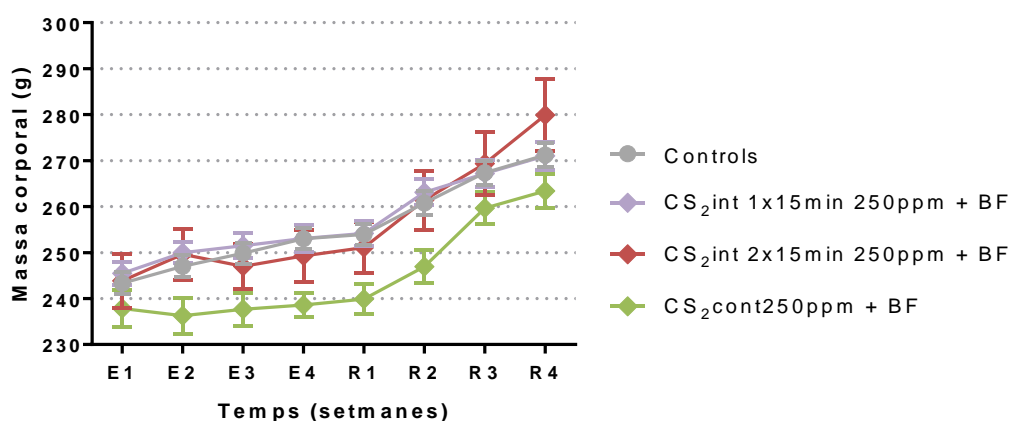
El protocol experimental (Fig. M1) i el nombre de rates (Taula M1) per aquesta part de l'estudi es troben a l'apartat de *Materials i Mètodes*.

### 5.3.1 Salut general dels animals

Com s'ha dit anteriorment, les rates implicades en les diferents exposicions van ser pesades i avaluades cada setmana (Morton and Griffiths, 1985) (Annex 1). Al llarg de tot el període d'exposició, els animals es trobaven en bona salut i no presentaven cap signe de patiment: no es van manifestar signes de debilitat, la quantitat d'ingesta d'aliments era normal, i el pèl dels animals tenia un bon aspecte.

Pel que fa a l'evolució del pes corporal de les rates, l'ANOVA de dos factors va indicar que la interacció "tractament" x "temps" era significativa [ $F(27,791) = 4,59$ ;  $p < 0,0001$ ]. Durant l'**exposició**, tant els animals control com els exposats al solvent de manera intermitent van mostrar un augment del pes, com es pot veure a la Figura R28. Entre T0 i T1, els animals control ( $n = 61$ ), els exposats a 1 pic de solvent ( $n = 23$ ) i els exposats a 2 pics ( $n = 14$ ) van presentar un augment de 9,6 g, 7,6 g i 5,4 g, respectivament. En canvi, s'apreciava com els individus exposats de manera contínua a 250 ppm de CS<sub>2</sub> ( $n = 19$ ) no mostraven increment de pes durant l'exposició, sinó que aquest es mantenia més o menys constant en el temps (+0,7 g). El test de Bonferroni va indicar augments significatius del pes dels animals control i exposats de manera intermitent al llarg de totes les setmanes d'exposició respecte el seu pes inicial, mentre que el grup co-exposat al solvent de manera contínua no va variar el seu pes corporal durant tot el període d'exposició.

Pel que fa al període de **recuperació**, es va observar un augment de pes a tots els grups d'animals, controls i exposats (Fig. R28). A més, no es van trobar diferències significatives de la mitjana de pes al final de la recuperació (T2) entre els grups [ $F(3, 113)=1,86$ ;  $p=0,141$ ].

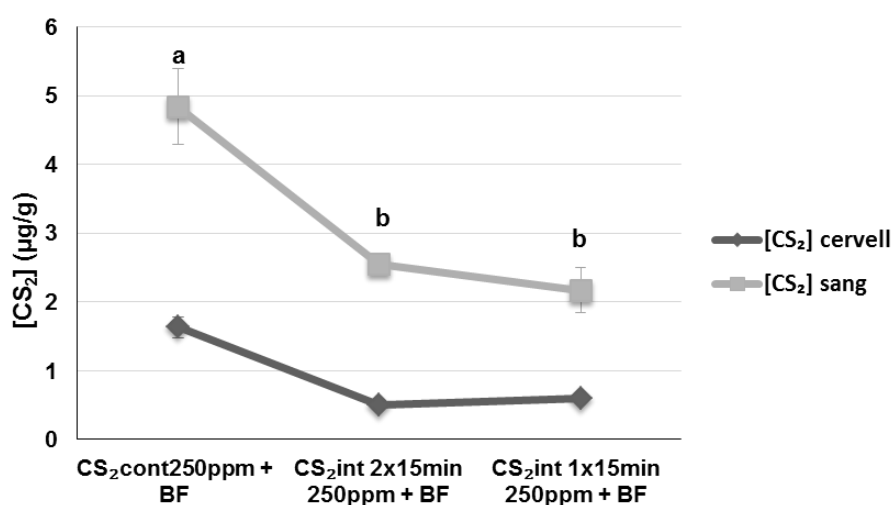


**Figura R28.** Evolució del pes corporal de les rates al llarg del període d'exposició (E) i el període de recuperació (R) per a tots els grups experimentals. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

## 5.3.2 Metabolisme

### 5.3.2.1 Concentració de CS<sub>2</sub> per una concentració atmosfèrica de 250 ppm amb diferents patrons temporals

La concentració de CS<sub>2</sub> sanguínia i cerebral, mesurada al final de l'exposició, segons el grup d'exposició, es troba representada en la Figura R29.



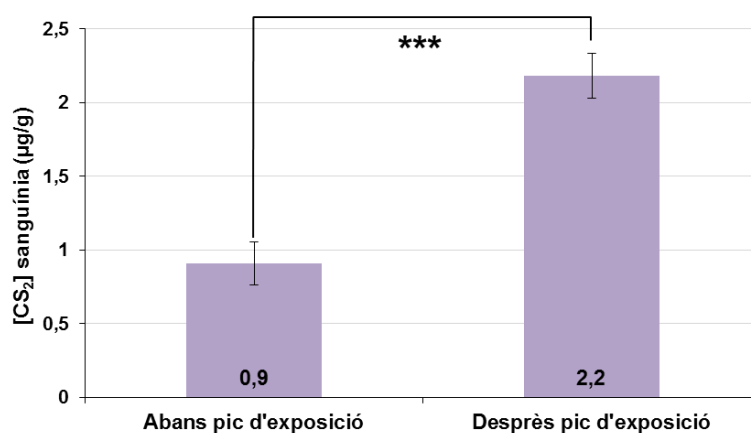
**Figura R29.** Relació entre la concentració de disulfur de carboni atmosfèrica (ppm) i la concentració sanguínia o cerebral (µg/g). Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM ( $n = 5$  pel grup continu;  $n = 7$  pel grup exposat a 2 pics de solvent;  $n = 5$  pel grup exposat a 1 pic de solvent). Les diferències estadístiques obtingudes pel mètode de Bonferroni es troben representades per lletres. Els grups amb la mateixa lletra no són significativament diferents, el contrari passa amb els grups amb lletres diferents.

#### 5.3.2.1.1 Concentració de CS<sub>2</sub>: atmosfèrica vs. sanguínia

La concentració sanguínia de CS<sub>2</sub> va presentar diferències significatives entre grups [ $F(2,16) = 16,7$ ;  $p = 0,0002$ ]. Quan la concentració atmosfèrica es va quadruplicar, és a dir, del grup exposat a un pic de solvent al grup exposat de manera contínua, la concentració en la sang sols augmenta un 223%, mentre que, quan la concentració atmosfèrica es va duplicar, entre el grup exposat a dos pics i l'exposat de manera contínua, la concentració sanguínia augmenta un 190%. Ara bé, entre el grup exposat a 1 pic i el grup exposat a 2 pics de solvent, on hi havia també una duplicació de la concentració atmosfèrica, la concentració en la sang es mantenia més o menys similar. Com era d'esperar, totes les mostres de rates control tenien concentracions sanguínies de CS<sub>2</sub> per sota del límit de detecció. Així doncs, el test de Bonferroni va indicar una diferència significativa entre el grup exposat de manera contínua i els altres dos grups, però no entre ambdós grups exposats de manera intermitent.

Per altra banda, es va comparar la concentració sanguínia del solvent abans i després del sisè pic de 15 min d'exposició a 250 ppm (Fig. R30). Es va trobar una clara diferència en la concentració de CS<sub>2</sub> sanguínia entre ambdós punts temporals [ $F(1,15) = 31,53$ ;  $p = 0,0001$ ].

Així doncs, podem constatar que 45 min després de l'exposició de 15 min a 250 ppm de CS<sub>2</sub>, la concentració del solvent va disminuir de manera significativa.



**Figura R30.** Comparació de la concentració sanguínia de CS<sub>2</sub> (µg/g) abans o després del sisè pic d'exposició a 250 ppm durant 15min. Els valors corresponen a la mitjana ± SEM ( $n = 8/\text{grup}$ ) \*\*\* $p = 0,0001$ , test Bonferroni

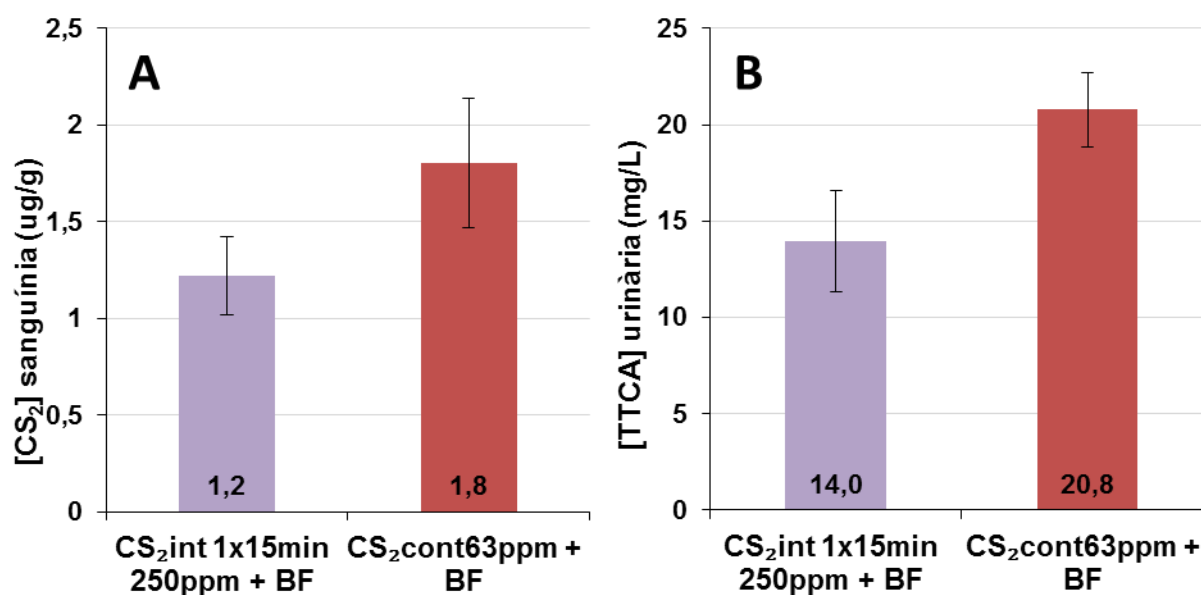
#### 5.3.2.1.2 Concentració de CS<sub>2</sub>: atmosfèrica vs. cerebral

La concentració de CS<sub>2</sub> cerebral, mesurada al final de l'exposició, segons el grup d'exposició, es troba representada també en la Figura R29. Com per la concentració de solvent en sang, es va observar una diferència estadísticament significativa entre els grups exposats al CS<sub>2</sub> en els diferents models d'exposició [ $F(2,16) = 45,39$ ;  $p < 0,0001$ ]. En aquest cas, quan la concentració atmosfèrica es va duplicar o quadruplicar, passant del grup exposat a 2 pics o 1 pic de solvent al grup exposat de manera contínua, la concentració de CS<sub>2</sub> augmenta un 321% i un 271%, respectivament. A més, entre els dos grups exposats de manera intermitent, on hi havia també una duplicació de la concentració atmosfèrica, la concentració en el cervell era similar. Les mostres control tenien concentracions sota del límit de detecció. Igual que en la sang, es va trobar una diferència significativa entre el grup exposat de manera contínua i els dos grups d'exposició intermitent, i no hi havia diferències significatives entre aquests darrers.

Si comparem la concentració de CS<sub>2</sub> que es troba a la sang amb la que es troba al cervell, observem una major presència de solvent dins la sang. Després de l'absorció, el CS<sub>2</sub> es transporta dins la sang per arribar als diferents òrgans (McKenna and DiStefano, 1977a).

### 5.3.2.2 Comparació entre 63 ppm continu i 250 ppm intermitent

Quan es compara l'exposició de 15 min/h a 250 ppm de CS<sub>2</sub> amb l'exposició contínua a 63 ppm de CS<sub>2</sub>, les quals han rebut una dosi equivalent de solvent al final de les 6 h d'exposició, podem observar que no hi ha diferències estadísticament significatives ni entre les concentracions de CS<sub>2</sub> sanguínies [ $F(1,14) = 1,77$ ;  $p = 0,2065$ ] ni entre les concentracions de TTCA urinàries [ $F(1,15) = 3,84$ ;  $p = 0,0701$ ] (Fig. R31).



**Figura R31.** Comparació del metabolisme entre dos grups amb igual dosi de solvent final (després de 6h d'exposició), però diferents patrons d'exposició: 63 ppm de manera contínua o 250 ppm durant 15min cada hora. (A) Comparació de la concentració sanguínia de CS<sub>2</sub> (µg/g). (B) Comparació de la concentració de TTCA urinària. Els valors corresponen a la mitjana ± SEM (n = 8/grup).



### 5.3.3 Efecte sobre l'audició

#### 5.3.3.1 Funció auditiva: productes de distorsió acústics

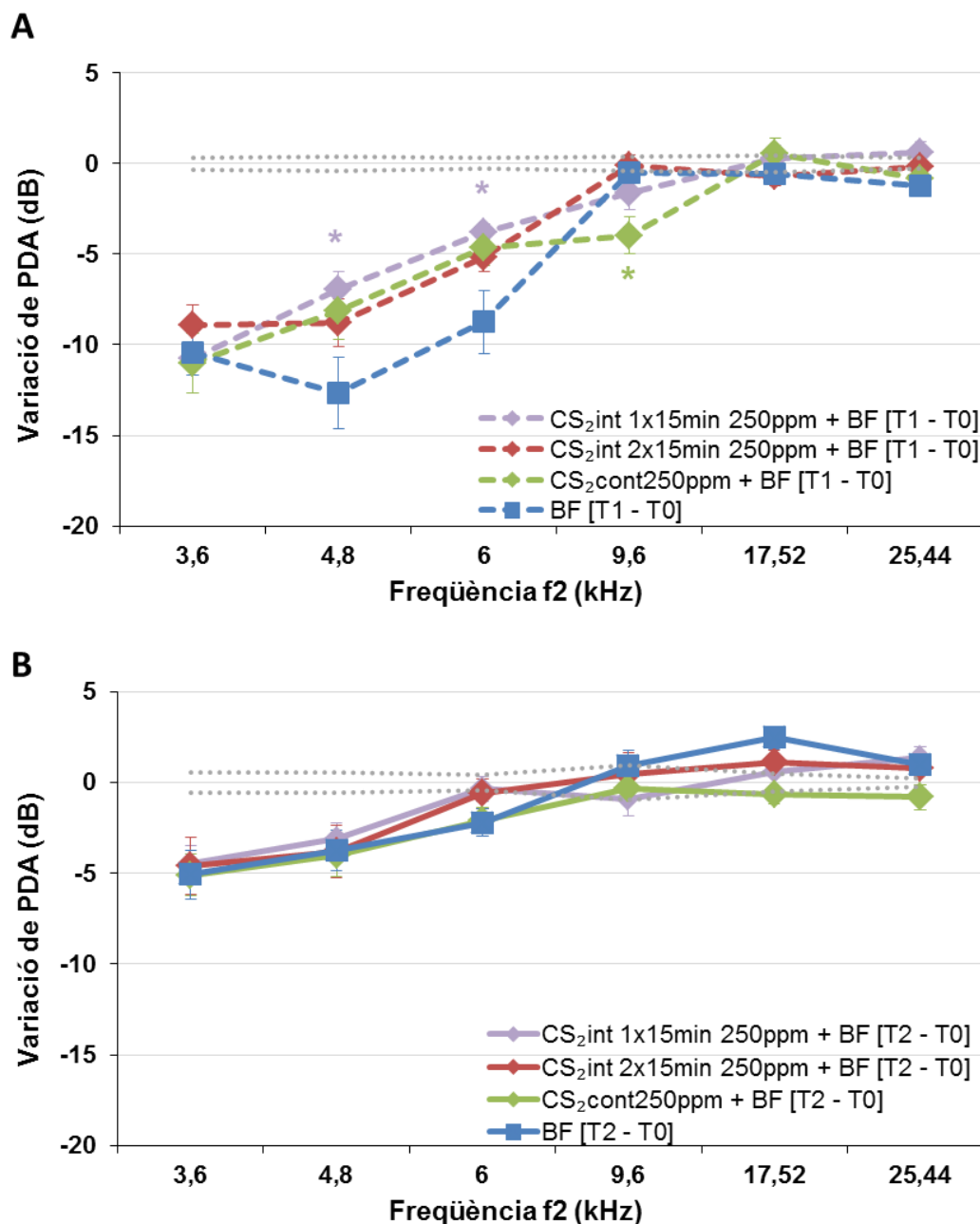
##### 5.3.3.1.1 Funció auditiva per una concentració de 250 ppm amb diferents patrons temporals

Com s'ha mencionat anteriorment, l'exposició al soroll continu va causar una disminució significativa en les amplituds del PDA entre 3,6 i 6 kHz. De la mateixa manera, l'exposició al soroll juntament a 250 ppm de CS<sub>2</sub> de manera intermitent, ja sigui 1 pic de 15 min cada hora o cada 30 min, va provocar una disminució significativa dels valors dels PDA a la sortida de l'exposició entre 3,6 i 6 kHz, sense diferències significatives entre ambdós grups. Igualment, com ja s'havia vist abans, la co-exposició contínua a 250 ppm de CS<sub>2</sub> va allargar el rang de freqüències malmeses fins a 9,6 kHz.

Si es compara la co-exposició amb l'exposició al soroll sol, els desplaçaments d'amplitud d'animals co-exposats a 4,8 i 6 kHz a la **sortida de l'exposició** van ser lleugerament inferiors que els dels animals exposats al soroll sol, és a dir, el CS<sub>2</sub> disminueix l'efecte del soroll sobre els valors de PDA, confirmant el que ja s'havia observat en els capítols anteriors (Taula R2). Al final de la co-exposició al solvent en mode intermitent 1x15 min/h, les pèrdues auditives eren significativament inferiors a les de l'exposició al soroll sol a 4,8 kHz ( $p = 0,0447$ ) i 6 kHz ( $p = 0,0477$ ) (Fig. R32). Finalment, a causa de l'extensió de les freqüències danyades al final de l'exposició contínua a 250 ppm de CS<sub>2</sub> esmentada abans, va existir una diferència significativa entre aquest grup i el grup exposat al soroll sol a 9,6 kHz ( $p = 0,0310$ ) (Fig. R32A).

No obstant això, després de les 4 setmanes de **recuperació**, per els dos grups co-exposats de manera intermitent, la gamma de freqüències amb una variació significativa de l'amplitud del PDA respecte el grup control era de 3,6 i 4,8 kHz, mentre que el grup exposat al soroll sol o co-exposat al solvent de manera contínua presentaven pèrdua auditiva fins a 6 kHz. Així doncs veiem que els dos grups d'exposició intermitent han tingut una bona recuperació a 6 kHz, sense diferències significatives respecte el grup control (1 pic de 15 min/h:  $p = 0,7161$  i 2 pics de 15 min/h:  $p = 0,5785$ ). Ara bé, no hi ha diferències estadísticament significatives al final de la recuperació entre els 4 grups estudiats en aquesta part (Fig. R32B).

Globalment, en cap de les freqüències trobem un efecte persistent del CS<sub>2</sub> sobre les variacions d'amplitud dels PDA causades pel soroll al final del període de recuperació, tant si l'exposició al solvent és contínua com intermitent (Fig. R32B).



**Figura R32.** Variacions dels PDA dels diferents grups experimentals. (A) Variacions dels PDA al final del període d'exposició:  $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposats} - [PDA1 - PDA0]_{Controls}$ . (B) Variacions dels PDA al final del període de recuperació:  $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposats} - [PDA2 - PDA0]_{Controls}$ . BF: soroll ric en baixes freqüències. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. La línia de punts representa la variabilitat del grup control (SEM). \*  $p < 0,05$ , significativament diferent a la mitjana del grup exposat a soroll sol, test de Bonferroni.

La Taula R2 indica, per a cada grup de rates exposades i per a cada freqüència, les pèrdues auditives a la sortida de l'exposició i al després de 4 setmanes de recuperació.

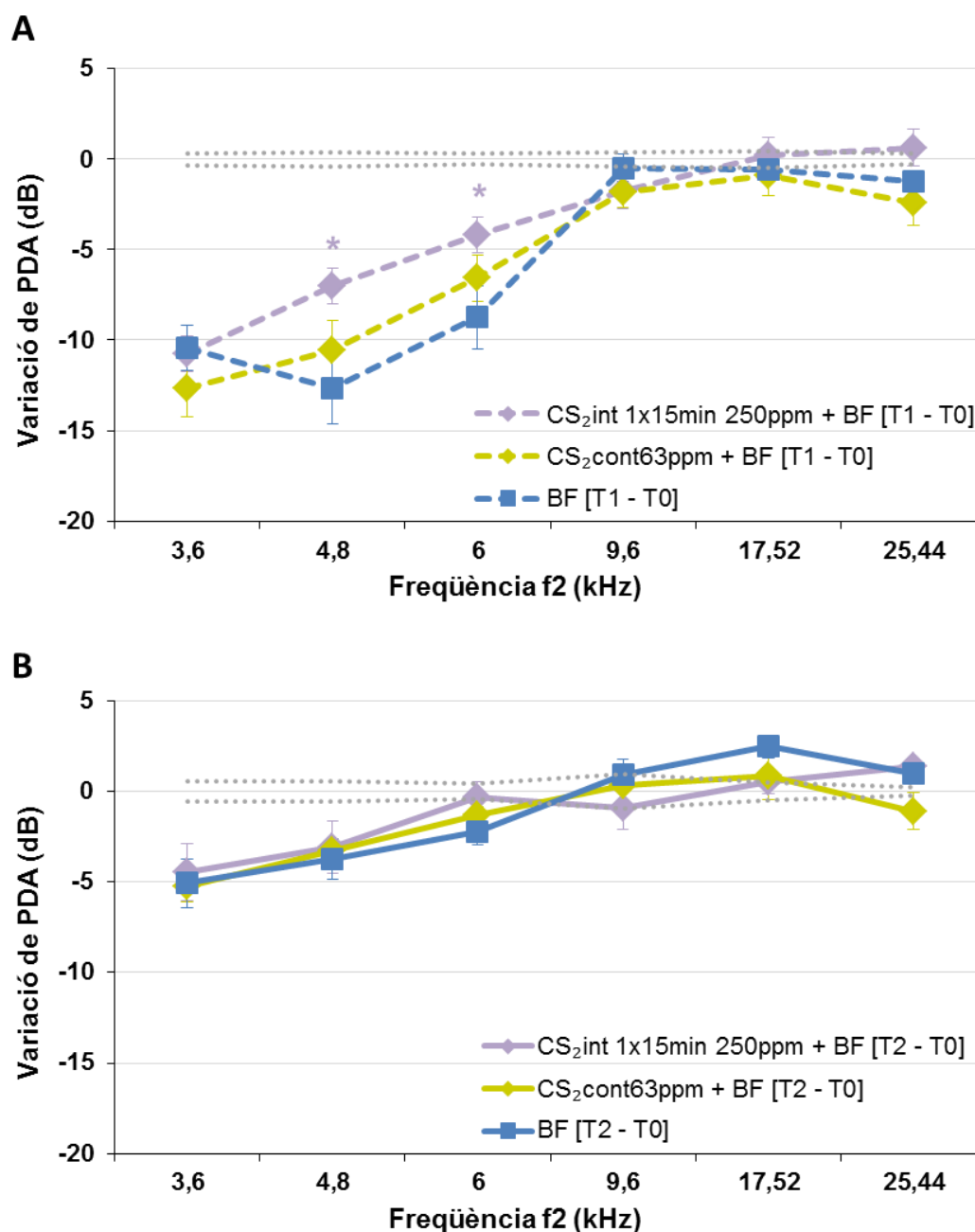
PDA f2 (kHz)	Mesura	BF	CS <sub>2</sub> int 1x15min 250ppm + BF	CS <sub>2</sub> int 2x15min 250ppm + BF	CS <sub>2</sub> cont250ppm + BF
3,6	[T1 – T0] *	-10,4	-10,8	-8,9	-11
	p	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
	[T2 – T0]	-5,1	-4,5	-4,6	-5,1
	p	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	0,007	<b>0,0000</b>
4,8	[T1 – T0]	-12,6	-6,9	-8,8	-8,1
	p	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
	[T2 – T0]	-3,7	-3,1	-3,8	-4
	p	<b>0,0002</b>	<b>0,0279</b>	<b>0,0288</b>	<b>0,0001</b>
6	[T1 – T0]	-8,7	-3,8	-5,2	-4,6
	p	<b>0,0000</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0033</b>
	[T2 – T0]	-2,2	-0,3	-0,6	-2,1
	p	<b>0,0006</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,0008</b>
9,6	[T1 – T0]	-0,5	-1,6	-0,1	-4
	p	<b>0,7518</b>	<b>0,7847</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,0115</b>
	[T2 – T0]	0,9	-0,9	0,5	-0,3
	p	<b>0,9710</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,8127</b>
17,52	[T1 – T0]	-0,5	0,2	-0,7	0,6
	p	<b>0,8939</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,6202</b>
	[T2 – T0]	2,5	0,6	1,1	-0,7
	p	<b>0,2772</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,3160</b>
25,44	[T1 – T0]	-1,2	0,6	-0,2	-0,8
	p	<b>0,2281</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,4767</b>
	[T2 – T0]	1	1,4	0,8	-0,8
	p	<b>0,2672</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,9999</b>	<b>0,4268</b>

**Taula R2.** Variacions dels PDA (amplitud, en dB) obtingut en tots els grups exposats al final de l'exposició ([T1 – T0] = [PDA1– PDA0]<sub>Exposats</sub> – [PDA1–PDA0]<sub>Controls</sub>) o al final del període de recuperació ([T2 – T0] = [PDA2– PDA0]<sub>Exposats</sub> – [PDA2–PDA0]<sub>Controls</sub>). P: probabilitat entre grups (exposat vs. control), en vermell quan la diferència és estadísticament significativa (p < 0,05). \* Càlcul amb els valors censurats a través del model "Tobit".

### 5.3.3.1.2 Comparació de la funció auditiva entre 63 ppm continu i 250 ppm intermitent

Es va comparar la funció auditiva d'ambdós grups co-exposats, i es va comprovar que no hi havia diferències significatives en cap de les freqüències mesurades, ni en el **final de l'exposició** ni després del període de **recuperació** (Fig. R33).

De tota manera, encara que no hi hagi diferències significatives entre aquests dos grups, al final de l'exposició, de 3,6 a 6 kHz, hi ha una menor pèrdua auditiva als animals exposats de manera intermitent, la qual cosa fa que hi hagi una diferència significativa entre aquest grup i el grup exposat al soroll sol a 4,8 i 6 kHz com ja s'ha dit al punt anterior (Fig. R33A). Al final de les 4 setmanes de recuperació, els tres grups presentaven les mateixes pèrdues auditives (Fig. R33B).



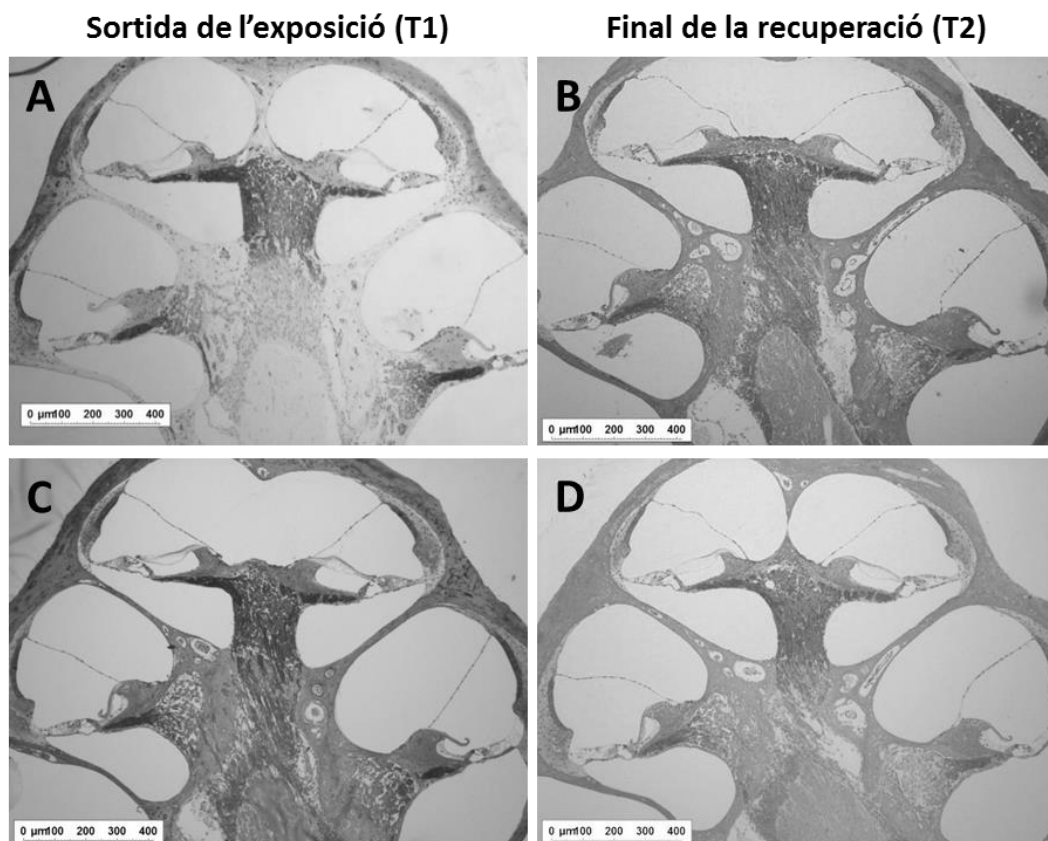
**Figura R33.** Variacions dels PDA dels diferents grups experimentals. (A) Variacions dels PDA al final del període d'exposició:  $[T1 - T0] = [PDA1 - PDA0]_{Exposats} - [PDA1 - PDA0]_{Controls}$ . (B) Variacions dels PDA al final del període de recuperació:  $[T2 - T0] = [PDA2 - PDA0]_{Exposats} - [PDA2 - PDA0]_{Controls}$ . BF: soroll ric en baixes freqüències. CS<sub>2</sub>: disulfur de carboni. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. La línia de punts representa la variabilitat del grup control (SEM). \*  $p < 0,05$ , significativament diferent a la mitjana del grup exposat a soroll sol, test de Bonferroni.

### 5.3.3.2 Anàlisis histològiques

#### 5.3.3.2.1 Talls semi-fins de la còclea (òrgan de Corti + gangli espiral)

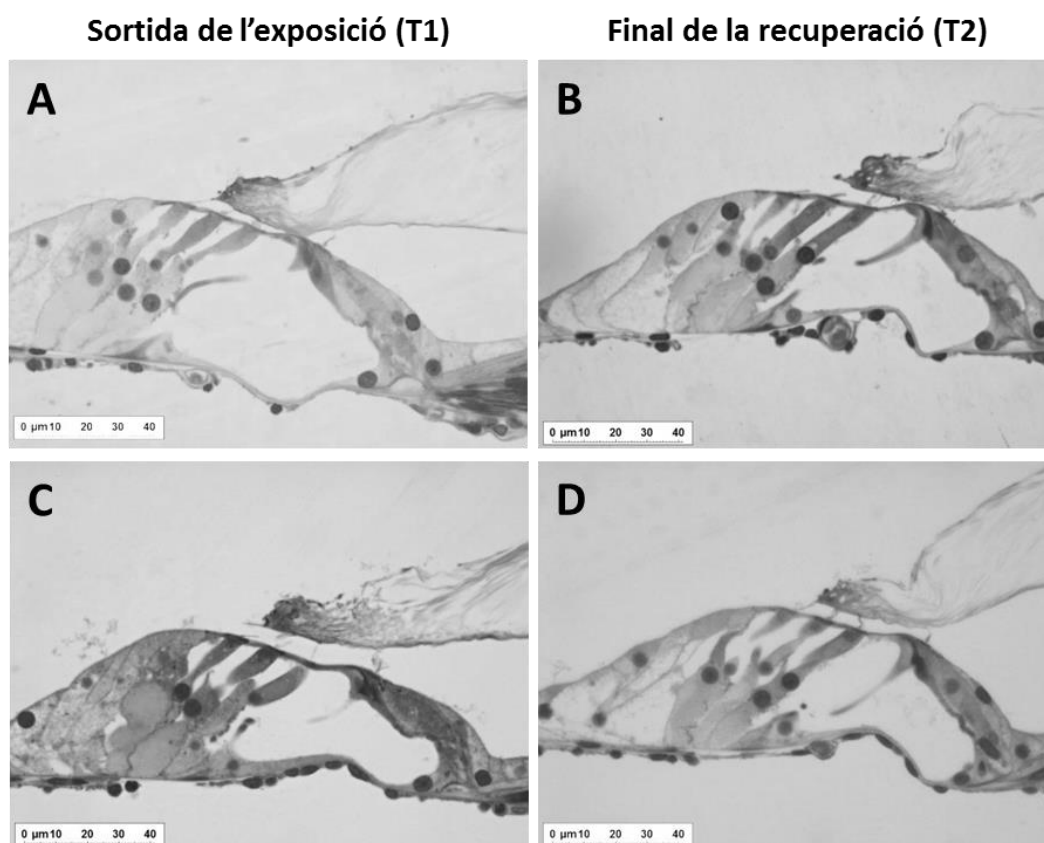
Les seccions semi-fines de les còclees incloses dins la resina epoxi es van observar a través del microscopi òptic per tal d'estudiar la morfologia de l'òrgan de Corti i dels cossos neuronals que es troben al gangli espiral.

Totes les còclees, d'animals co-exposats de manera intermitent i controls (n = 10/grup), presentaven una morfologia general similar, tant al final de l'exposició com 4 setmanes després del període de recuperació (Fig. R34).

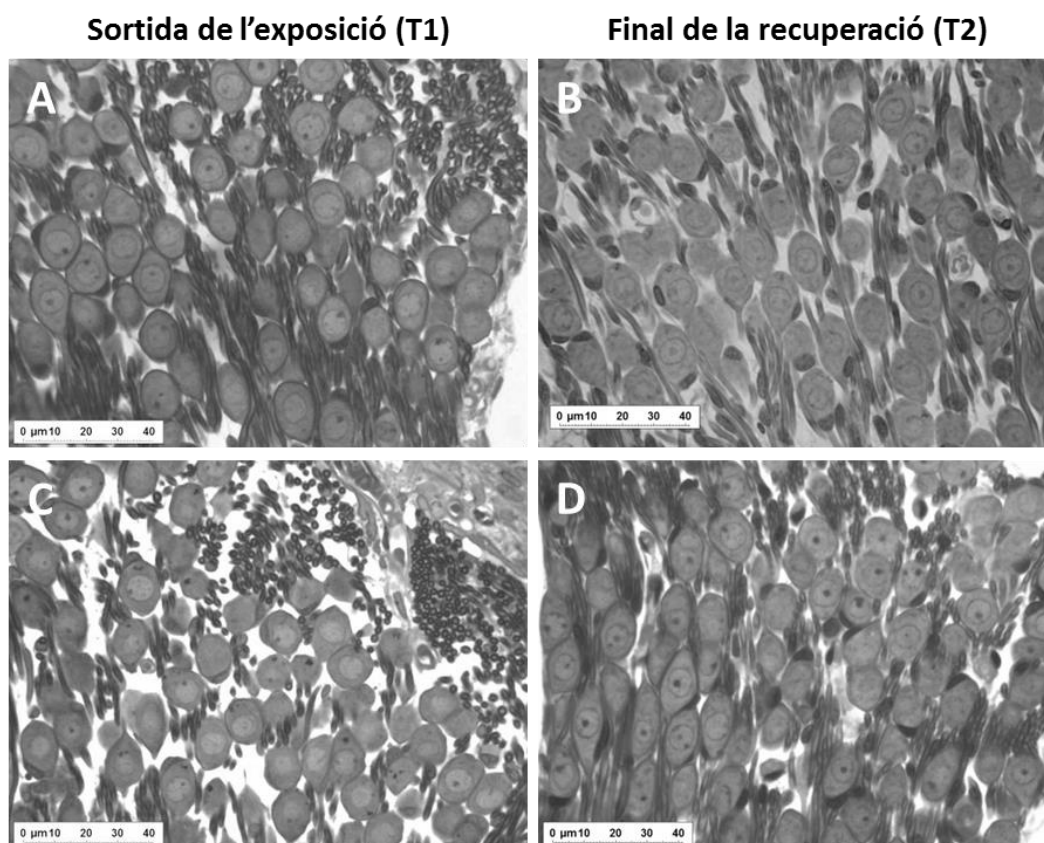


**Figura R34.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea observats al final de l'exposició (esquerre) i al final del període de recuperació (dreta). (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 15 min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.

A més, es van observar les tres files de CCE i la fila de CCI, les cèl·lules de Deiters i les de Hensen amb unes característiques normals i similars en tots els grups al final del període d'exposició i després de la recuperació de 4 setmanes (Fig. R35). Igualment, els cossos cel·lulars de les neurones que es troben en el gangli coclear tenien un aspecte normal i igual al de les rates control també a la sortida del darrer dia d'exposició i al final de la recuperació (Fig. R36).



**Figura R35.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea al final de l'exposició (esquerra) i al final del període de recuperació (dreta) on s'observen els òrgans de Corti amb les tres cèl·lules ciliades externes i una cèl·lula ciliada interna, amb la membrana tectorial unida als estereocilis. (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 15min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.



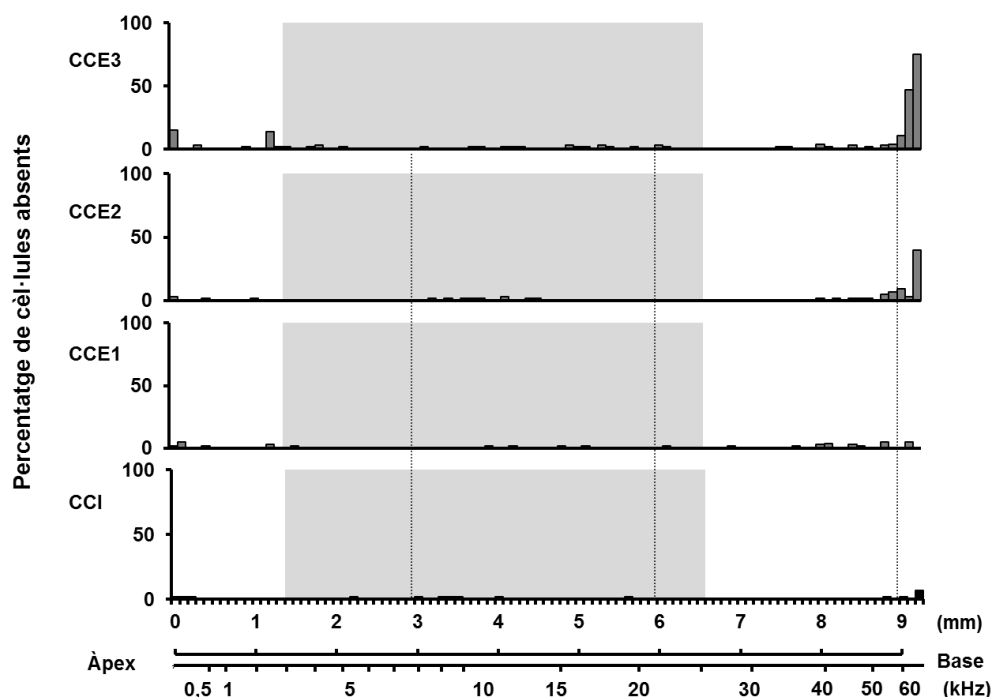
**Figura R36.** Microscòpia òptica de talls semi-fins de la còclea al final de l'exposició (esquerre) i al final del període de recuperació (dreta) on s'observen els cossos cel·lulars de les neurones del gangli espiral apical. (A-B) Animal control. (C-D) Animal exposat a 15min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.

### 5.3.3.2.2 Cocleograma

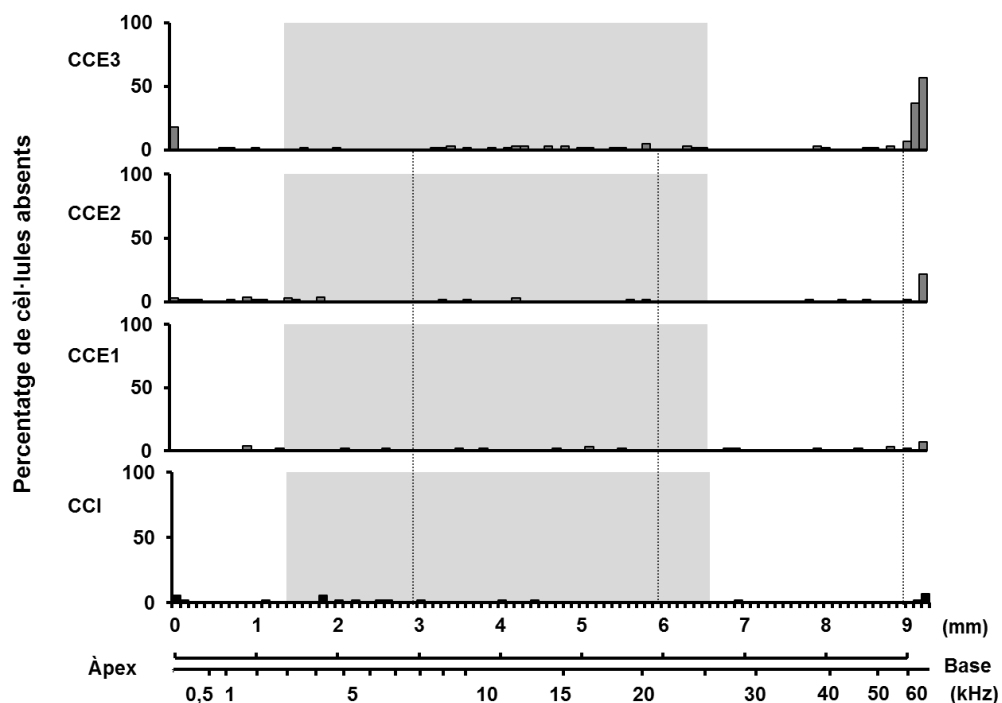
Al final del període de recuperació de 4 setmanes, es van comptar les cèl·lules ciliades a través del microscopi òptic per tal de determinar el percentatge de cèl·lules absent.

Igual que passa a les exposicions precedents, el cocleograma obtingut amb la mitjana de 5 rates control són similars als obtinguts amb els animals exposats, sigui quin sigui el tractament (Fig. R37). En tots els grups es van observar quantitats molt petites d'absència de cèl·lules ciliades al llarg de l'òrgan de Corti. Com en els animals controls, la pèrdua de CCI i les CCE de la primera fila mai va excedir l'1%, i pèrdues de entre 1 i 2% es van mesurar en la segona i tercera files de CCE. Com s'ha dit ja en el primer capítol, l'absència d'algunes CCE a l'extrem basal es deu a la morfologia coclear.

Així doncs, tot i que la pèrdua d'audició induïda per l'exposició, ja sigui pel soroll sol com juntament amb el solvent de manera intermitent, fos significativa en les freqüències mesurables més baixes, no hi va haver una pèrdua visible de cèl·lules (Fig. R38).



**Figura R37.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates controls 4 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.



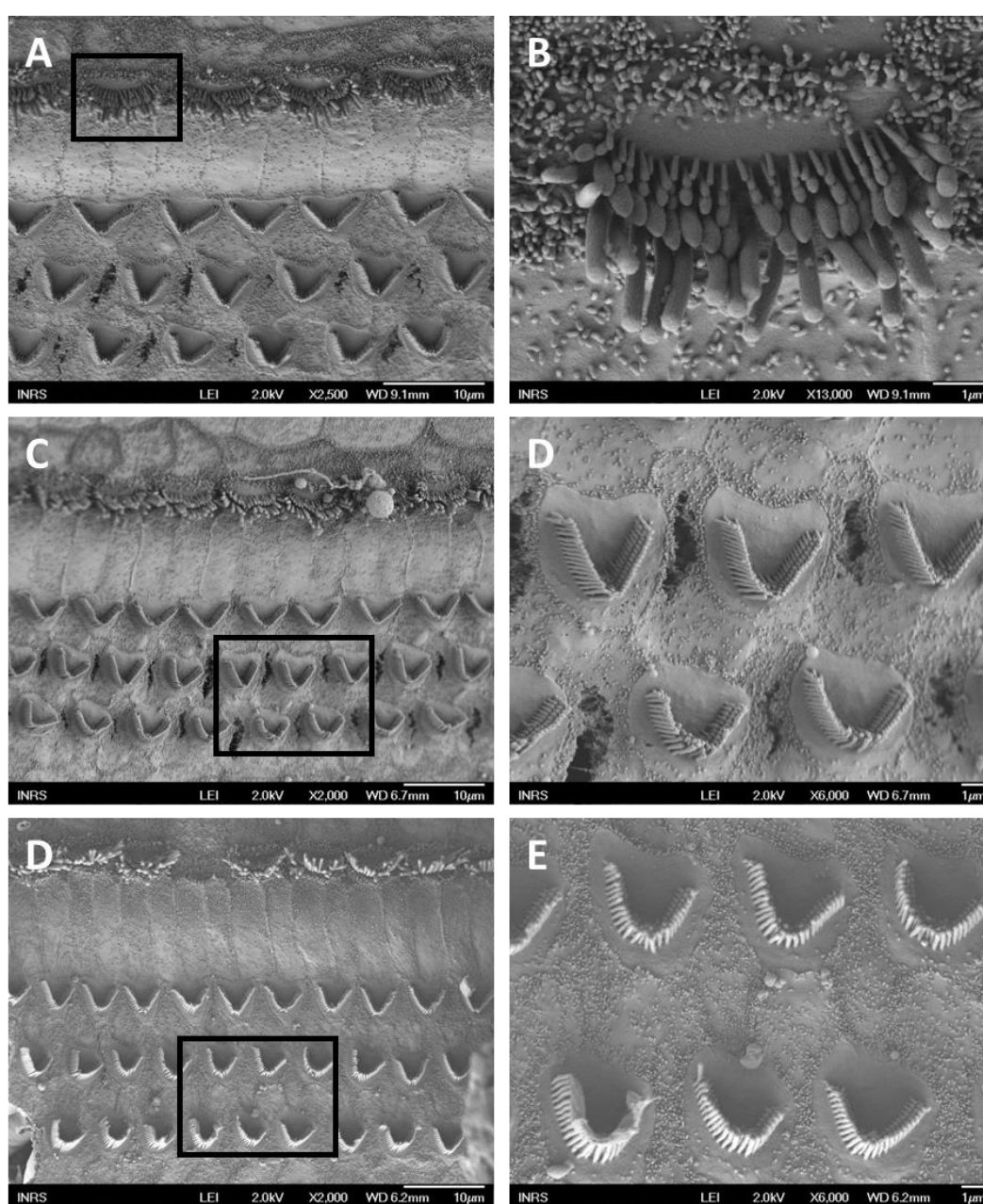
**Figura R38.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates exposades a 250 ppm de disulfur de carboni 15 min/h + soroll 4 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana.



### 5.3.3.2.3 MER de la còclea

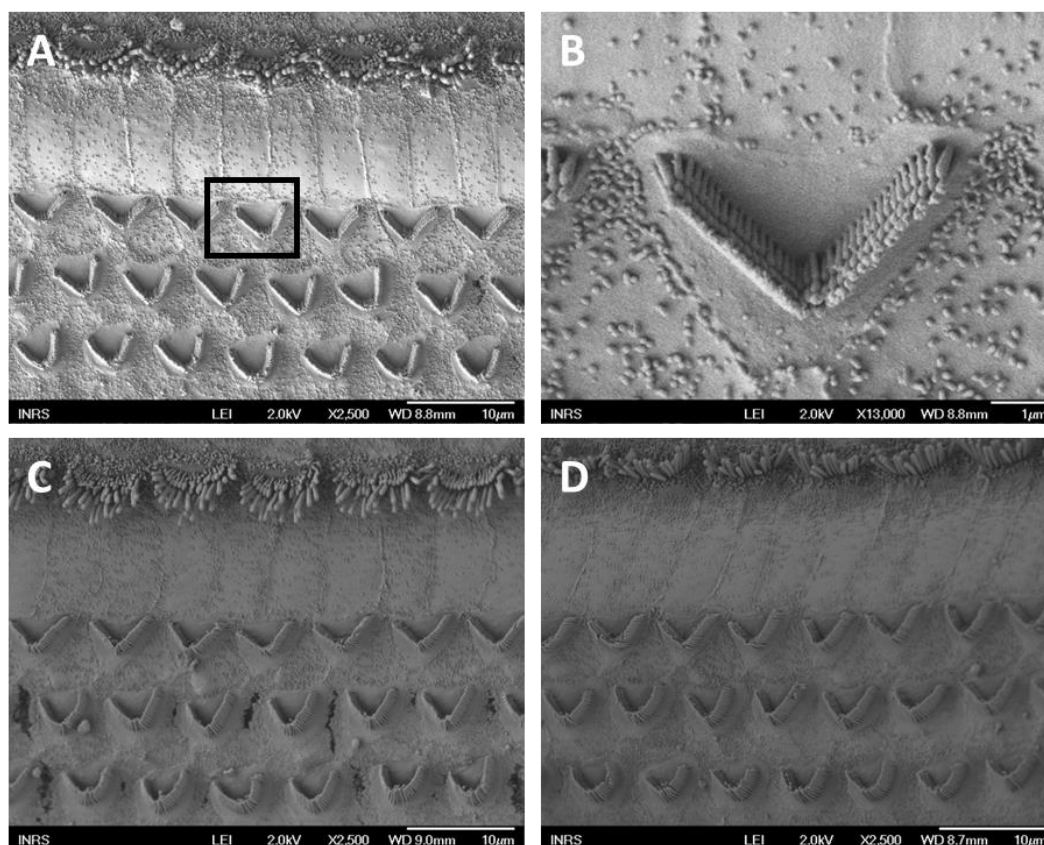
Finalment, es van observar els òrgans de Corti per MER al final de la recuperació per tal d'avaluar l'estat dels estereocilis de les cèl·lules ciliades ( $n = 3/\text{grup}$ ).

Aquestes observacions histològiques confirmaven que les mostres control d'aquest estudi tenien les mateixes característiques morfològiques que les rates adultes normals: feixos ciliars intactes emergint des de la placa cuticular cap a l'espai endolimfàtic, abundants microvellositats a la superfície apical de les cèl·lules de suport i no hi ha pèrdua significativa de cèl·lules ciliades (Fig. R39).



**Figura R39.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals control observats al final del període de recuperació. (A-B) 15 kHz: vista general de l'organització dels estereocilis (X2500) (A) i ampliació dels feixos ciliars d'una cèl·lula ciliada interna (X13000) (B). (C-D) 12 kHz: vista general de l'organització dels estereocilis (X2000) (C) i ampliació dels feixos ciliars de dues files de cèl·lules ciliades externes (X6000) (D). (D-E) 8 kHz: vista general de l'organització dels estereocilis (X2000) (D) i ampliació dels feixos ciliars de dues files de cèl·lules ciliades externes (X6000).

Independentment del grup, no es va observar cap evidència de lesió a nivell dels estereocilis, com es mostra pel grup co-exposat de manera intermitent a la Figura R40. Aquestes imatges reforcen la idea de que la co-exposició amb CS<sub>2</sub> no danya els estereocilis.



**Figura R40.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals exposats a 250 ppm de disulfur de carboni durant 15min/h i al soroll continu al final del període de recuperació. (A-B) 14 kHz: vista general de l'organització dels estereocilis (X2500) (A) i ampliació d'una cèl·lula ciliada externa (B). (C) 11 kHz: vista general de l'organització dels estereocilis (X2500). (D) 8 kHz: vista general de l'òrgan de Corti (X2500).

### 5.3.4 Efecte sobre el sistema vestibular

#### 5.3.4.1 Funció vestibular: nistagme post-rotatori

##### 5.3.4.1.1 Funció vestibular per una concentració de 250 ppm amb diferents patrons temporals

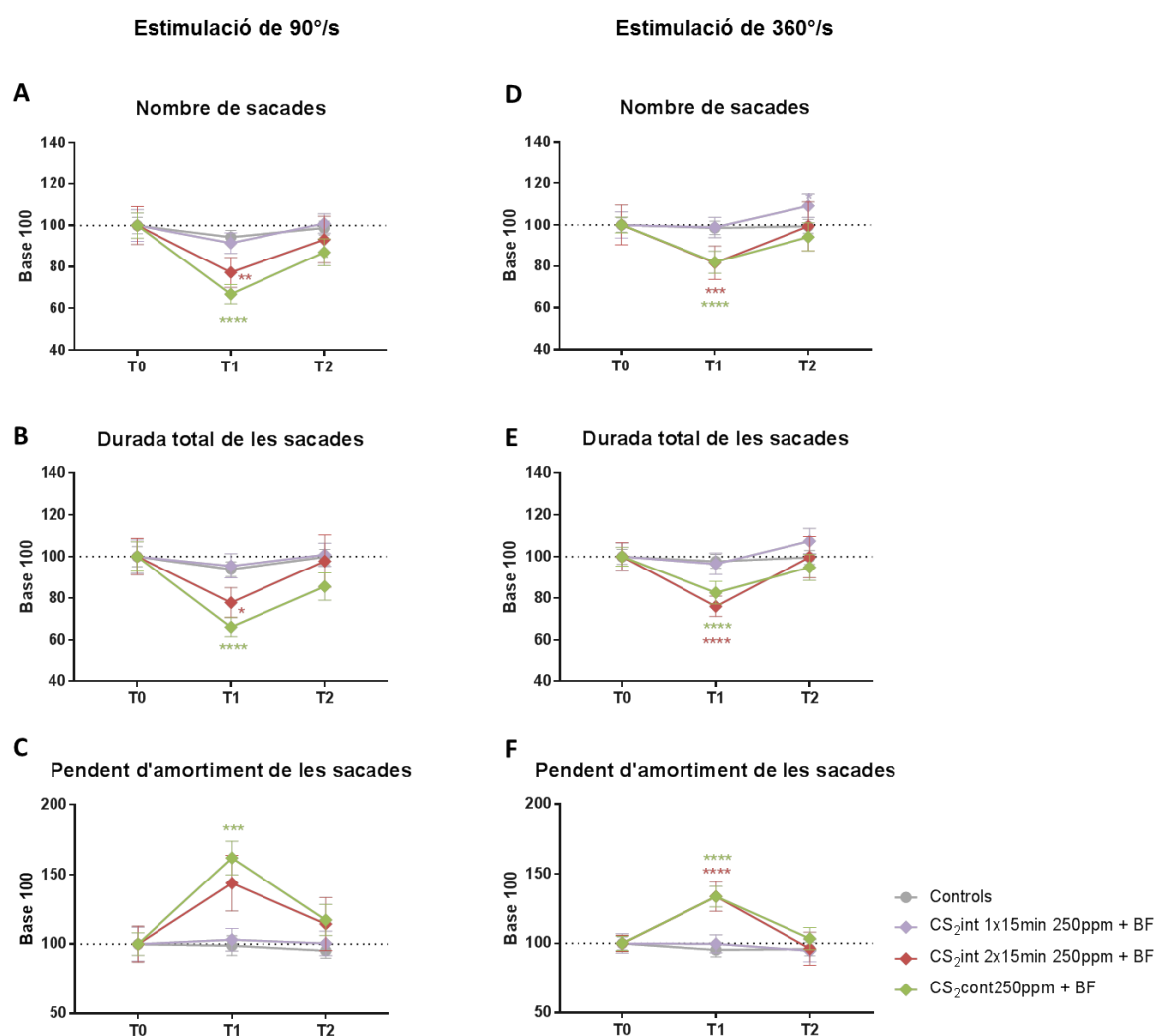
La Figura R41 il·lustra les mitjanes del nombre de sacades (A i D), durada total de les sacades (B i E) i pendent d'amortiment de les sacades (C i F), obtinguts en els diferents grups experimentals: controls, CS<sub>2</sub> 250 ppm intermitent (1 x 15 min/h) + soroll, CS<sub>2</sub> 250 ppm intermitent (2 x 15 min/h) + soroll, CS<sub>2</sub> 250 ppm continu + soroll, abans de l'exposició (T0), després de 4 setmanes d'exposició (T1) i després de la recuperació (T2).

Després d'una **estimulació a 90°/s**, l'anàlisi de variàncies de dos factors va mostrar una interacció significativa “tractament” x “temps” pel nombre de sacades [ $F(6,124) = 3,33$ ;  $p = 0,0045$ ], la durada [ $F(6,126) = 2,67$ ;  $p = 0,0181$ ] i la pendent d'amortiment de les sacades [ $F(6,124) = 2,5$ ;  $p = 0,0254$ ] (Fig. R41A-C).

Tant el grup d'animals control com el grup co-exposat a 1 pic de 250 ppm de CS<sub>2</sub> no van presentar, ni a T1 ni a T2, cap canvi significatiu respecte els valors mitjans de T0 en cap dels paràmetres analitzats. La co-exposició CS<sub>2</sub> 250 ppm intermitent 2 x 15 min/h + soroll va provocar una disminució significativa del nombre de sacades (-23 %;  $p = 0,0075$ ) i de la durada (-22 %;  $p = 0,0289$ ) a T1, però no va provocar canvi de la pendent d'amortiment de les sacades ( $p = 0,0779$ ). Ambdós paràmetres van tenir una evident recuperació al final de les 4 setmanes de recuperació fent que no presentessin diferències significatives respecte els seus valors a T0 (nombre de sacades:  $p = 0,7541$ ; durada de les sacades:  $p > 0,9999$ ). Finalment, la co-exposició al solvent de manera contínua, al final de l'exposició, va causar una disminució significativa dels tres paràmetres: nombre de sacades (-34 %;  $p < 0,0001$ ), durada de les sacades (34 %;  $p < 0,0001$ ) i pendent d'amortiment (-62 %;  $p = 0,0002$ ). A T2, es va observar una recuperació parcial dels tres paràmetres, però els valors no eren significatius T0 (nombre de sacades: -13 %;  $p = 0,0506$ , durada de les sacades: -14%;  $p = 0,0609$  i pendent d'amortiment: -17%;  $p = 0,5242$ ).

L'estimulació a 360°/s va provocar una interacció significativa "tractament" x "temps" pels tres paràmetres analitzats; nombre de sacades [ $F(6,116) = 5,87$ ;  $p < 0,0001$ ], durada de sacades [ $F(6,124) = 5,72$ ;  $p < 0,0001$ ] i pendent d'amortiment de les sacades [ $F(6,116) = 9,96$ ;  $p < 0,0001$ ] (Fig. R41D-F).

Igual que a la velocitat lenta, el grup control i el grup co-exposat a 1 pic de 250 ppm de CS<sub>2</sub> es van mantenir estables durant tot l'experiment pels tres paràmetres. No obstant, el grup co-exposat a 2 pics de solvent i el grup co-exposat de manera contínua van presentar una disminució significativa en el nombre de sacades (-18 %;  $p = 0,0001$ , per ambdós grups), en la durada total (-24 % i -17 %, respectivament;  $p < 0,0001$ ) i la pendent d'amortiment de les sacades (-34 %;  $p < 0,0001$ , per ambdós grups). En tots els paràmetres i per a tots els grups es va observar una recuperació total a T2.



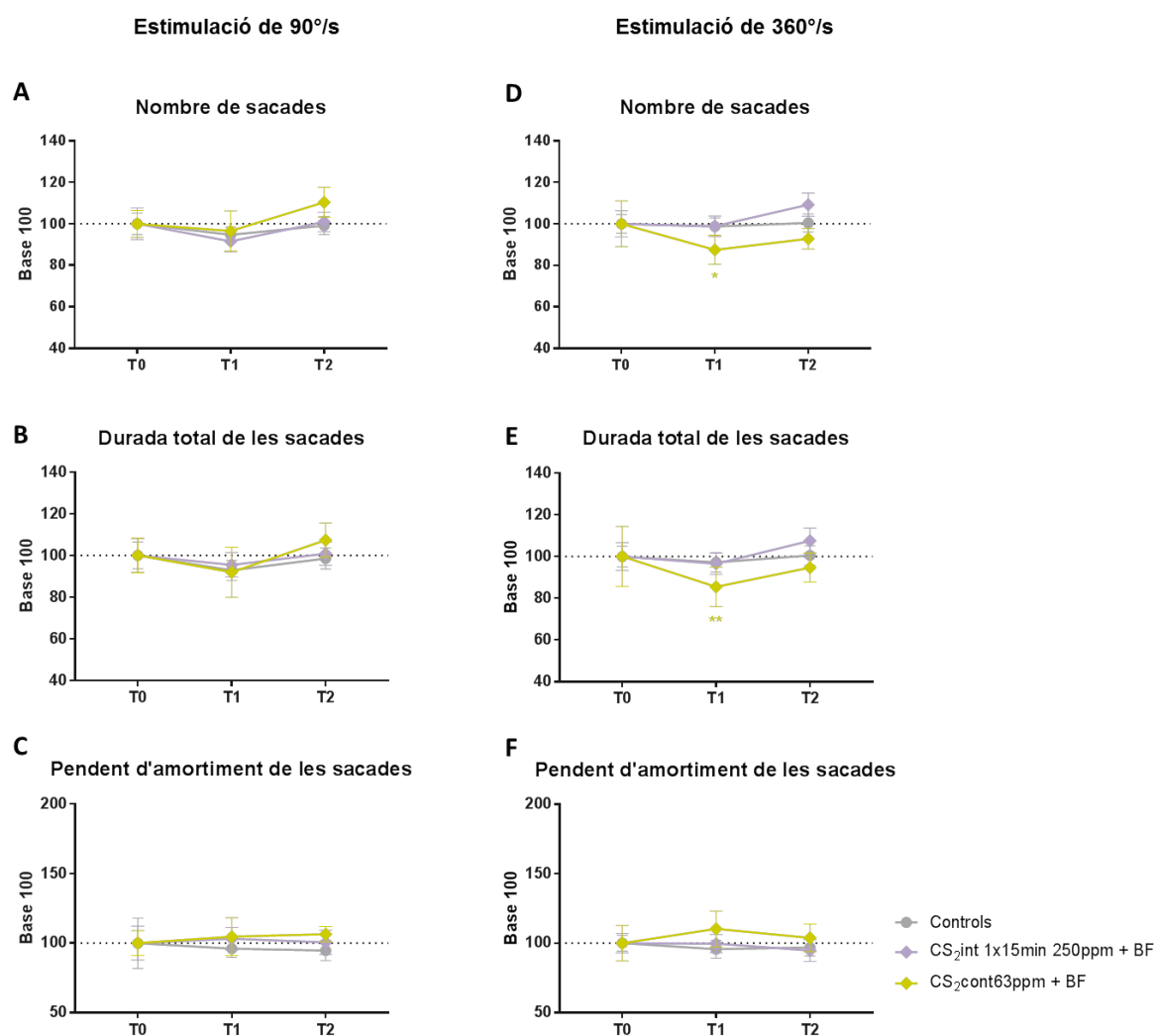
**Figura R41.** Nistagme post-rotatori. Nombre de sacades (A i D), durada de les sacades (B i E) i pendent d'amortiment de les sacades (C i F) després d'una estimulació de 40 s a 90°/s (esquerra) o a 360°/s (dreta) mesurades per cada grup experimental a T0, T1 i T2 expressats com a percentatge respecte els valors basals. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , significativament diferents de la mitjana a T0, test de Bonferroni.

#### **5.3.4.1.2 Comparació de la funció vestibular entre 63 ppm continu i 250 ppm intermitent**

Com es mostra a la Figura R42, a **velocitat lenta (90°/s)**, ambdós grups d'animals co-exposats, igual que els animals controls, van romandre estables al llarg de tot l'experiment. Per tant, no es van trobar diferències significatives respecte els valors basals de cada grup, ni després de l'exposició (T1) ni després de la recuperació (T2) a cap dels tres grups.

Per contra, després de **l'estimulació a 360°/s**, sí es van trobar canvis significatius en els animals co-exposats a 63 ppm de manera contínua en el nombre de sacades (-13 %;  $p = 0,0206$ ) i en la durada total de les sacades (-15 %;  $p = 0,0099$ ) al final de les 4 setmanes d'exposició (Fig. R42D-F). Així i tot, aquestes disminucions van ser sols transitòries ja que a T2 no trobem cap diferència significativa en cap dels paràmetres respecte els valors inicials. A diferència del grup d'exposició contínua a 63 ppm, el grup exposat a 250 ppm de manera intermitent va restar inalterable durant les tres mesures, igual que el grup control.

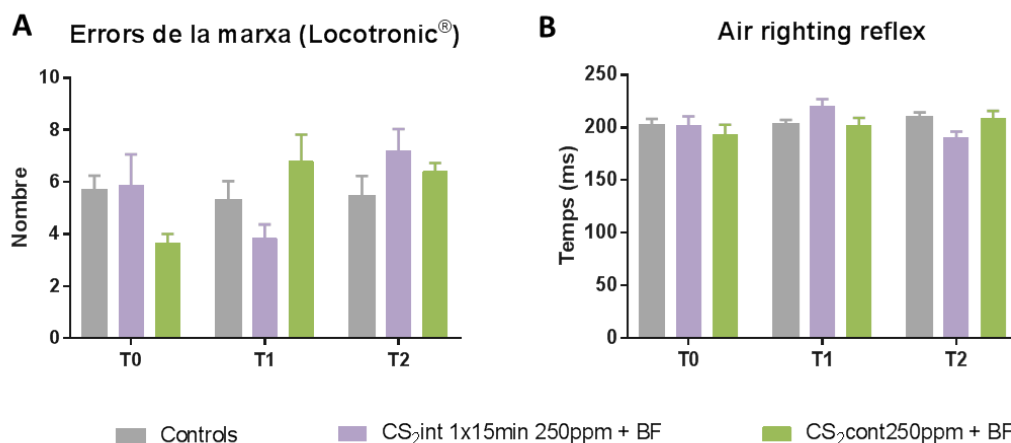
Així doncs, trobem que a velocitat ràpida els animals co-exposats presenten un comportament diferent si el solvent s'administra de manera continua durant les 6 hores d'exposició o es fa en pics intermitents de concentracions més elevades amb una dosi total final similar.



**Figura R42.** Nistagme post-rotatori. Nombre de sacades (A i D), durada de les sacades (B i E) i pendent d'amortiment de les sacades (C i F) després d'una estimulació de 40 s a 90°/s (esquerre) o a 360°/s (dreta) mesurades per cada grup experimental a T0, T1 i T2 expressats com a percentatge respecte els valors basal. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , significativament diferents de la mitjana a T0, test de Bonferroni.

### 5.3.4.2 Comportament

Encara que els dos tests comportamentals que es van analitzar presentaven una diferència significativa pel que fa a la interacció “tractament” x “temps”: **errors de la marxa** [ $F(4,62) = 2,82$ ;  $p = 0,0324$ ] i **air-righting reflex** [ $F(4,54) = 3,32$ ;  $p = 0,0168$ ], com es pot comprovar a la Figura R43, cap dels tres grups va presentar diferències significatives respecte el seu valor a T0, ni a la sortida de l'exposició ni 4 setmanes després.



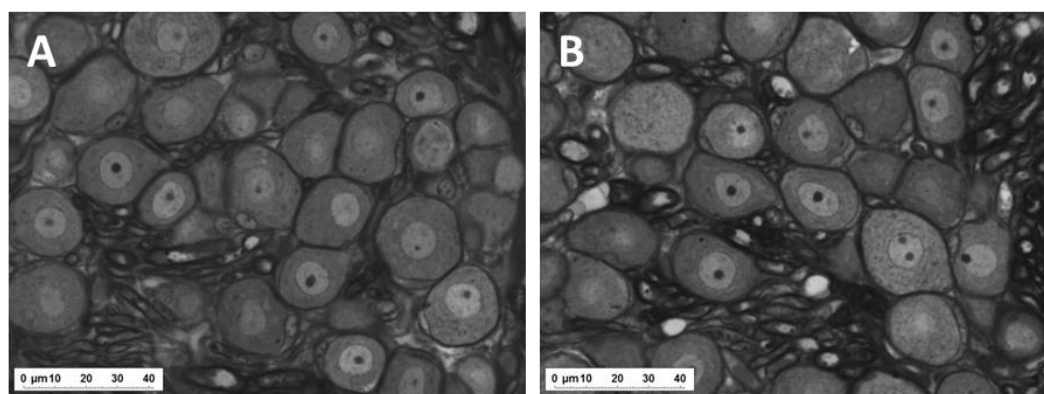
**Figura R43.** Tests comportamentals. La funció vestibular es va avaluar a través de diversos tests abans (T0), al final de l'exposició (T1) i després de 4 setmanes de recuperació (T2). Errors de la marxa (A) i air-righting reflex (B). Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

### 5.3.4.3 Anàlisis histològiques

#### 5.3.4.3.1 Gangli de Scarpa

Les seccions semi-fines dels ganglis vestibulars inclosos dins la resina es van observar a través del microscopi òptic per tal d'estudiar la morfologia dels cossos cel·lulars de les neurones ganglionars (n = 5/grup).

Al final del període de recuperació, els ganglis dels animals co-exposats al solvent de manera intermitent (Fig. R44B) presentaven una morfologia similar als animals controls (Fig. R44A).

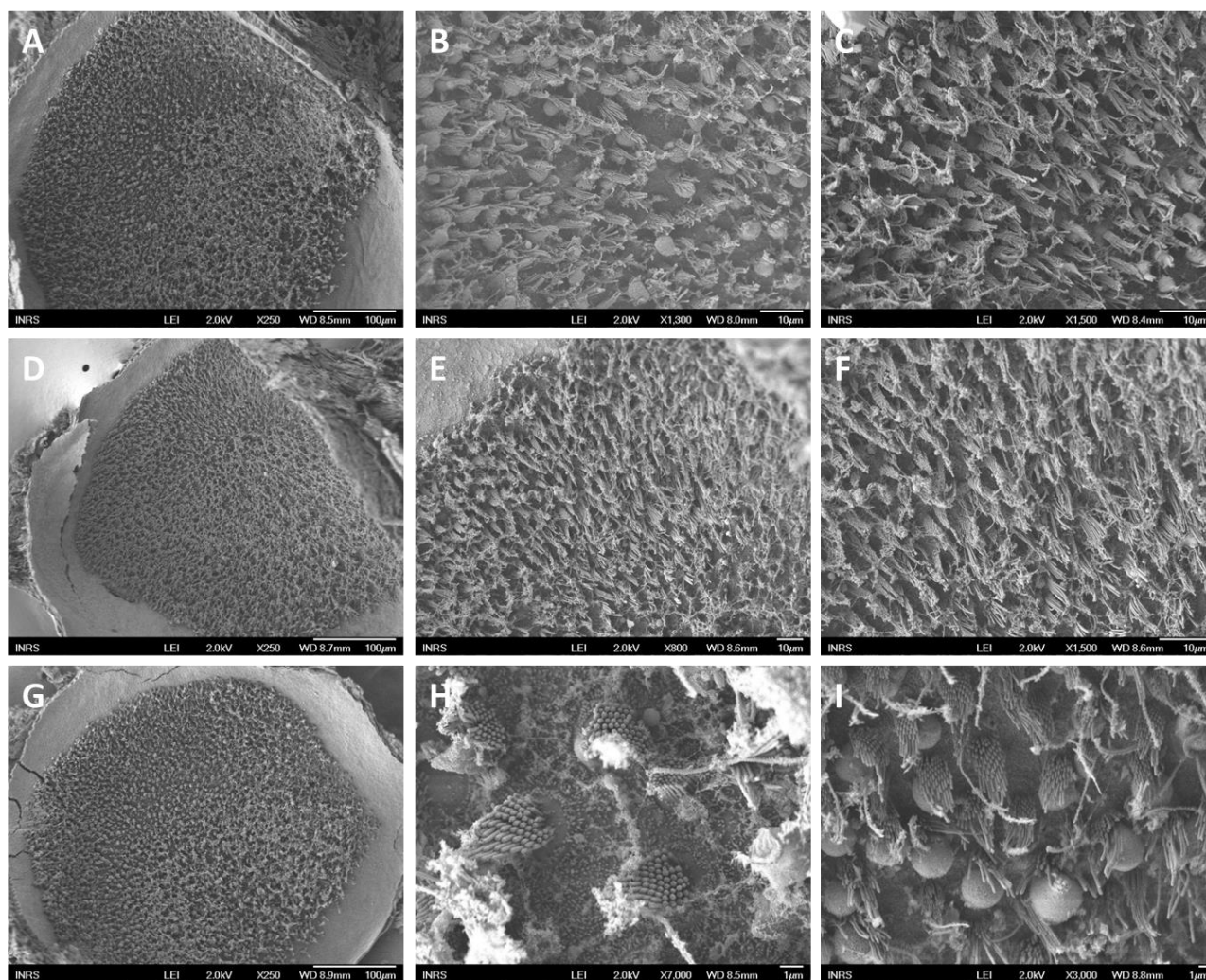


**Figura R44.** Microscòpia òptica de talls semi-fins del gangli de Scarpa al final del període de recuperació on s'observen els cossos cel·lulars de les neurones del gangli vestibular. (A) Animal control. (B) Animal co-exposat a 15 min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.



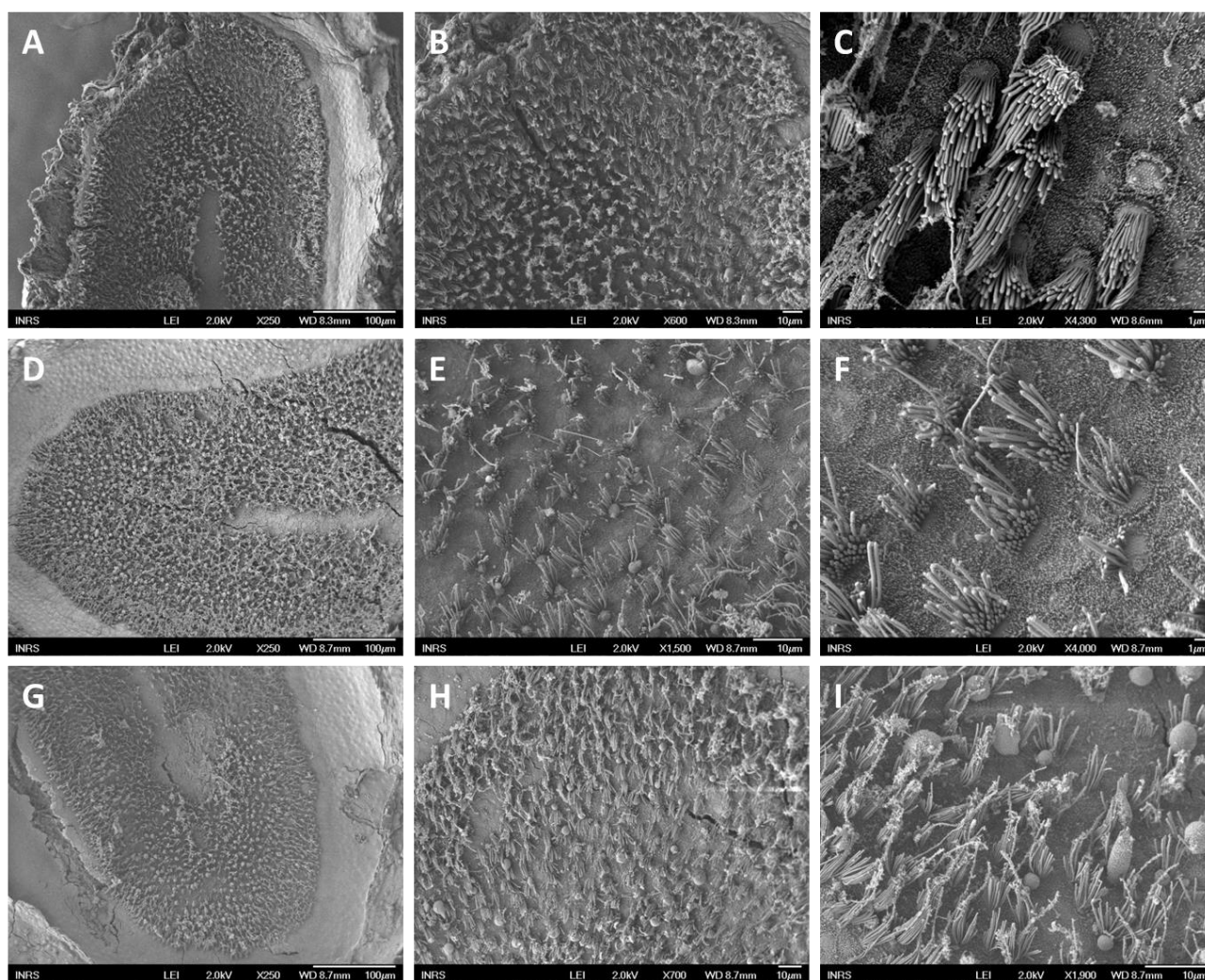
### 5.3.4.3.2 MER del vestíbul

La Figura R45 il·lustra els resultats de la superfície de les mostres d'utrícles per MER després del període de recuperació. Igualment, a la Figura R46 es poden observar els sàculs d'un animal control ( $n = 4$ ), exposat a soroll sol ( $n = 2$ ) o co-exposat amb 250 ppm continu de solvent ( $n = 2$ ).



**Figura R45.** Microscòpia electrònica de rastreig dels epitelis sensorials de l'utricle al final del període de recuperació. (A-C) Animal control. (D-F) Animal exposat al soroll de baixa freqüència. (G-I) Animal co-exposat a 15 min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.





**Figura R46.** Microscòpia electrònica de rastreig dels epitelis sensorials del sàcul al final del període de recuperació. (A-C) Animal control. (D-F) Animal exposat al soroll de baixa freqüència. (G-I) Animal co-exposat a 15 min/h de 250 ppm de disulfur de carboni + soroll.

Les observacions de les mostres control, tant de l'utricle (Fig. R45A-C), com del sàcul (Fig. R46A-C) van mostrar unes característiques morfològiques similars a les descrites en la literatura per les rates adultes normals (Dechesne et al., 1986; Hunter-Duvar, 1983; Llorens et al., 1993). La superfície de les preparacions permet l'observació de la part apical de les cèl·lules sensorials vestibulars, caracteritzades pels seus feixos ciliars intactes emergint de la placa cuticular, i les cèl·lules de suport no sensorials amb abundants microvellositats (Fig. R46C). Així doncs, com era d'esperar, les mostres controls d'aquests experiments no presenten característiques patològiques. Igual passa en les mostres dels animals exposats durant 4 setmanes al soroll o a la combinació soroll + CS<sub>2</sub>.

## **5.4. CAPÍTOL IV:**

### **EFFECTE DEL CS<sub>2</sub> SOBRE EL ROM**



Com s'ha vist en els resultats anteriors, el CS<sub>2</sub> pot modificar el **ROM** i debilitar encara més la resistència als sorolls de l'òrgan de Corti.

Diferents estudis en rates han mostrat que alguns solvents poden tenir un efecte farmacològic sobre el nucli olivo-coclear. Aquests efectes expliquen, almenys parcialment, la modificació per la co-exposició al solvent dels efectes del soroll sobre l'audició (Campo et al., 2007; Venet et al., 2015, 2011; Wathier et al., 2016).

Per comprovar experimentalment aquest efecte del CS<sub>2</sub>, les rates són exposades a dos tipus de soroll de similar espectre però diferent estructura temporal (continu vs. impulsu) per tal de comparar l'impacte sobre l'audició quan es troben associats al solvent. El soroll impulsu no sempre activa el ROM i, encara que aquest actuï, el retard en la seva activació permet a tota l'energia acústica penetrar dins la còclea. Contràriament, l'energia acústica del soroll continu que entra dins la còclea disminueix considerablement a causa de l'efecte protector d'aquest reflex (Venet et al., 2015). La concentració de CS<sub>2</sub> utilitzada és de 250 ppm durant 15 min a cada hora (amb 45 min d'aire pur entre dos pics) ja que és la dosis mínima en que, en sortir d'exposició, s'ha observat una disminució de la pèrdua auditiva als animals co-exposats respecte a la pèrdua soferta pels animals exposats a soroll sol.

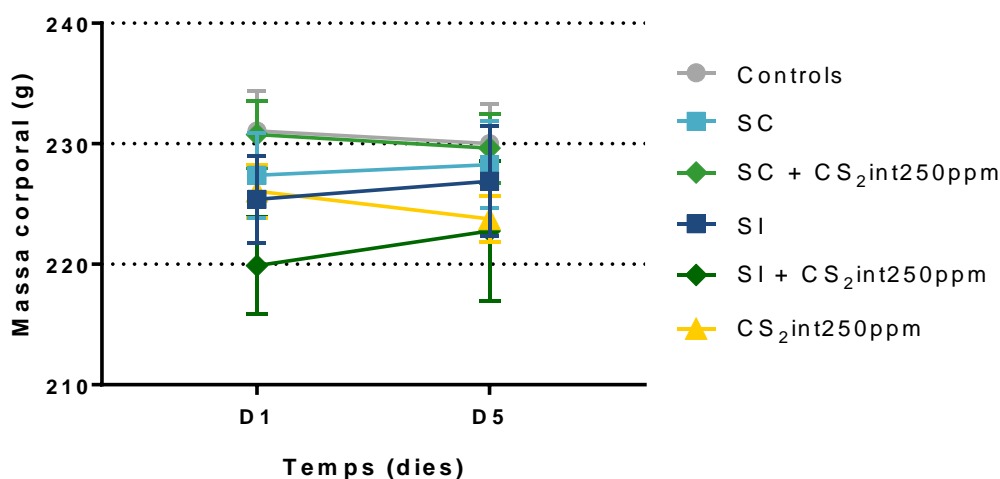
Per tant, l'objectiu principal és comprovar si l'exposició a cada un dels sorolls té efectes diferents quan es combinen amb el CS<sub>2</sub> a causa de la possible pertorbació del ROM induït pel solvent. Lògicament, en aquesta part de l'estudi sols ens interessem pels efectes sobre l'audició, analitzant la seva pertorbació a través dels PDA i l'observació de la còclea a través de diferents tècniques histològiques.

El protocol experimental (Fig. M2) i el nombre de rates (Taula M2) per aquesta part de l'estudi es troben a l'apartat de *Materials i Mètodes*.

### 5.4.1 Salut general dels animals

Els animals es van pesar just abans de començar l'exposició (d1) i el darrer dia d'intoxicació (d5). Igualment, es van observar totes les rates, tant exposades (n = 48) com controls (n = 30) i es va avaluar el seu estat general de salut, d'acord amb el protocol estàndard definit per Morton and Griffiths (1985) (Annex 1).

Durant els 5 dies d'exposició, la mitjana del pes corporal va romandre estable, sense canvis significatius entre el primer i darrer dia a cap dels grups experimentals (Fig. R47). Ni el temps [ $F(1,72) = 0,07$ ;  $p = 0,7979$ ] ni el tractament [ $F(5,72) = 0,8$ ;  $p = 0,5552$ ] van influir sobre l'evolució del pes corporal.



**Figura R47.** Evolució del pes corporal de les rates entre el començament de l'exposició (D1) i el final de l'exposició (D5) per a tots els grups experimentals. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

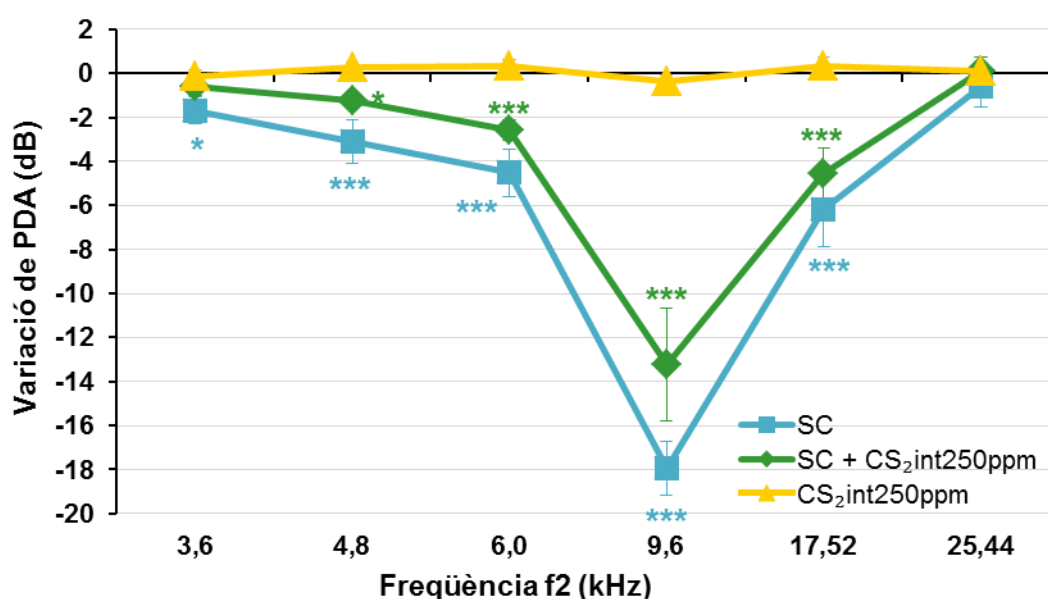
## 5.4.2 Funció auditiva

### 5.4.2.1 Exposició al CS<sub>2</sub> i/o al soroll (continu o impulsiu)

El grup d'animals exposat de manera intermitent a **250 ppm de CS<sub>2</sub>** ( $[\text{CS}_2]_{\text{real}} = 228,8 \pm 16,4$  ppm) no va mostrar variacions significatives en les amplituds del PDA en comparació amb els animals control per a qualsevol de les freqüències primàries mesurades (Fig. R48).

L'exposició al **soroll continu** amb una  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  de 89 dB SPL va provocar canvis significatius respecte el grup control en totes les freqüències mesurades excepte a 25,44 kHz (Fig. R48). La diferència màxima es va mesurar a 9,6 kHz, d'uns 18 dB (Mitjana<sub>control</sub> =  $0,2 \pm 0,19$  dB, Mitjana<sub>exposats</sub> =  $-17,95 \pm 1,24$  dB) la qual correspon a mitja banda d'octava per sobre de la freqüència d'exposició (8 kHz).

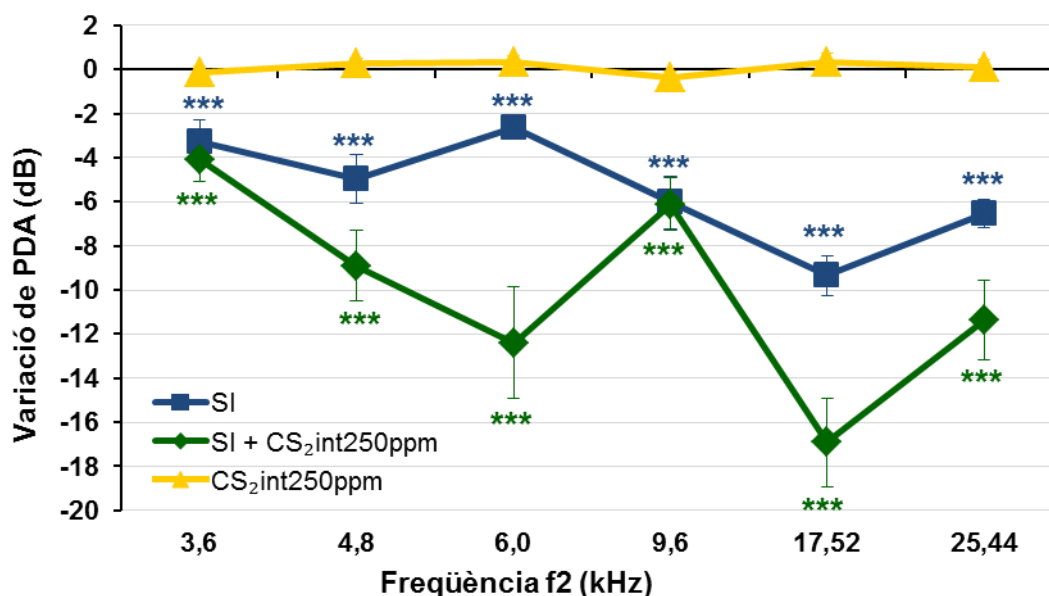
La **co-exposició al soroll continu i a 250 ppm de CS<sub>2</sub>** ( $[\text{CS}_2]_{\text{real}} = 242 \pm 15,9$  ppm) també va donar pèrdues significatives entre els animals exposats i els controls a partir de 4,8 fins a 17,52 kHz (Fig. R48). Com anteriorment, l'amplitud màxima va ser localitzada a 9,6 kHz (Mitjana<sub>control</sub> =  $0,2 \pm 0,34$  dB, Mitjana<sub>exposats</sub> =  $-13,21 \pm 2,55$  dB) (Fig. R48).



**Figura R48.** Variació de la pèrdua d'audició:  $[(\text{PDA2}-\text{PDA1})_{\text{exposats}} - (\text{PDA2}-\text{PDA1})_{\text{controls}}]$  per a tres condicions experimentals. CS<sub>2</sub>: 250 ppm de disulfur de carboni, 15 min per hora, 6 h per dia durant 5 dies ( $n = 8$ ). SC: soroll continu amb una  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  de 89 dB SPL ( $n = 8$ ). SC+CS<sub>2</sub>: soroll continu + 250 ppm de disulfur de carboni. Cada corba indica la diferència en les amplituds de PDA obtingudes per cada parell de freqüències mesurades. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , significativament diferent del la mitjana dels controls pel test Bonferroni.

El **soroll impulsiu** amb una  $L_{EX,8h}$  de 84 dB va provocar una pèrdua d'audició significativa entre rates exposades i control en totes les freqüències mesurades ( $p < 0,001$ ) (Fig. R49). La pèrdua d'audició va ser d'uns 9 dB a 17,5 kHz ( $Mitjana_{control} = 0,05 \pm 0,2$  dB,  $Mitjana_{exposats} = -9,35 \pm 0,92$  dB), i més de 6 dB a 9,6 i 25,44 kHz.

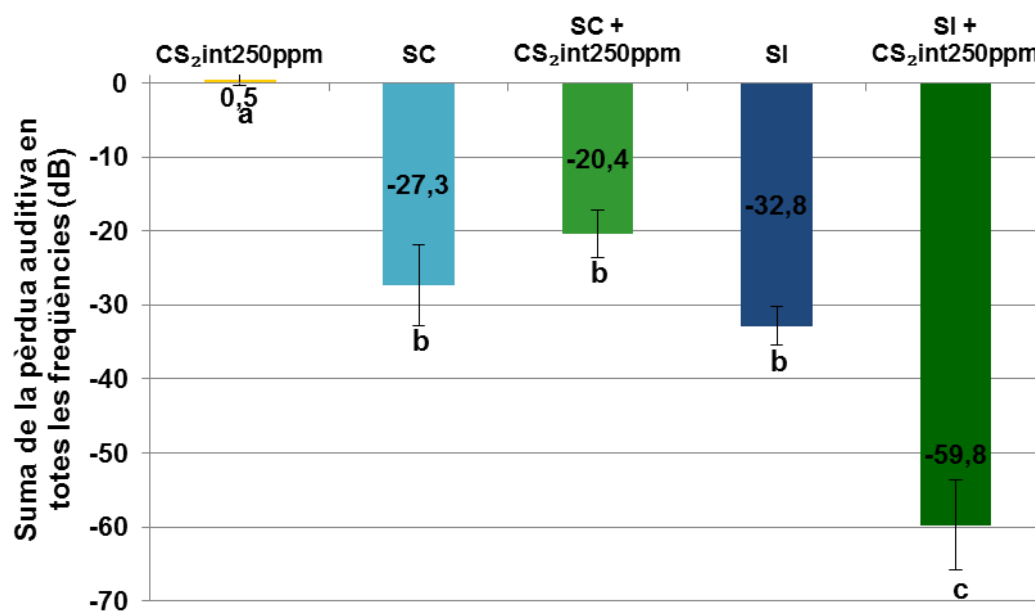
La **co-exposició a 250 ppm de CS<sub>2</sub>** ( $[CS_2]_{real} = 234,9 \pm 19,1$  ppm) associat amb el **soroll impulsiu** va potenciar significativament l'impacte traumàtic del soroll provocant diferències estadísticament significatives ( $p < 0,001$ ) entre animals exposats i controls en totes les freqüències (Fig. R49). Com per l'exposició al soroll impulsiu sol, l'amplitud màxima es localitza a 17,5 kHz ( $Mitjana_{control} = 0,05 \pm 0,3$  dB,  $Mitjana_{exposat} = -16,9 \pm 2$  dB).



**Figura R49.** Variació de la pèrdua d'audició:  $[(PDA2-PDA1)_{exposats} - (PDA2-PDA1)_{controls}]$  per a tres condicions experimentals. CS<sub>2</sub>: 250 ppm de disulfur de carboni, 15 min per hora, 6 h per dia durant 5 dies ( $n = 8$ ). SI: soroll impulsiu amb una  $L_{EX,8h}$  de 84 dB SPL ( $n = 8$ ). SI+CS<sub>2</sub>: soroll impulsiu + 250 ppm de disulfur de carboni. Cada corba indica la diferència en les amplituds de PDA obtingudes per cada parell de freqüències mesurades. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$ , significativament diferent del la mitjana dels controls pel test Bonferroni.

### 5.4.2.2 Comparació entre les diferents condicions experimentals

Es van analitzar les variacions de la funció auditiva en tots els grups comparant la pèrdua auditiva general, és a dir, la suma de la pèrdua auditiva per a totes les freqüències mesurades.



**Figura R50.** Histograma amb la suma de pèrdua auditiva en totes les freqüències mesurades en les diferents condicions experimentals. Pèrdua auditiva =  $[(PDA2-PDA1)_{\text{exposats}} - (PDA2-PDA1)_{\text{controls}}]$ . CS<sub>2</sub>: 250 ppm de disulfur de carboni, 15 min per hora, 6 h per dia durant 5 dies. SC: soroll continu amb una  $L_{EX,8h}$  de 89 dB SPL. SI: soroll impulsiu amb una  $L_{EX,8h}$  de 84 dB SPL. Eix Y: suma de la variació de les amplituds del PDA a 3,6, 4,8, 6, 9,6, 17,5 i 25,4 kHz mesurat amb una intensitat de la freqüència primària de 60 dB. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM. Les diferències estadístiques obtingudes mitjançant el test de Bonferroni es troben representades per lletres. Els grups amb la mateixa lletra no són significativament diferents, el contrari passa amb els grups amb lletres diferents.

L'anàlisi va indicar que no hi havia diferències significatives entre la pèrdua d'audició provocada pel soroll continu ( $-27,3 \pm 5,5$  dB) i pel soroll impulsiu ( $-32,8 \pm 2,6$  dB) [ $F(1,15) = 0,84$ ;  $p = 0,3751$ ] (Fig. R50). Tot i que la  $L_{EX,8h}$  era menor pel soroll impulsiu que pel continu, aquest resultat era l'esperat ja que la intensitat d'ambdós va ser prèviament escollida per induir una pèrdua d'audició similar a ambdós grups exposats al soroll sol.

L'exposició al CS<sub>2</sub> no va provocar cap variació significativa en les amplituds dels PDA ( $0,5 \pm 0,8$  dB), la qual cosa demostra que no té la capacitat de provocar toxicitat a nivell coclear (Fig. R50). Així doncs, es va trobar una diferència significativa entre el grup exposat al CS<sub>2</sub> sol i els altres animals exposats al soroll sol o en co-exposició amb aquest solvent ja que aquests animals si presenten una pèrdua auditiva [ $F(1,39) = 25,87$ ;  $p < 0,001$ ].



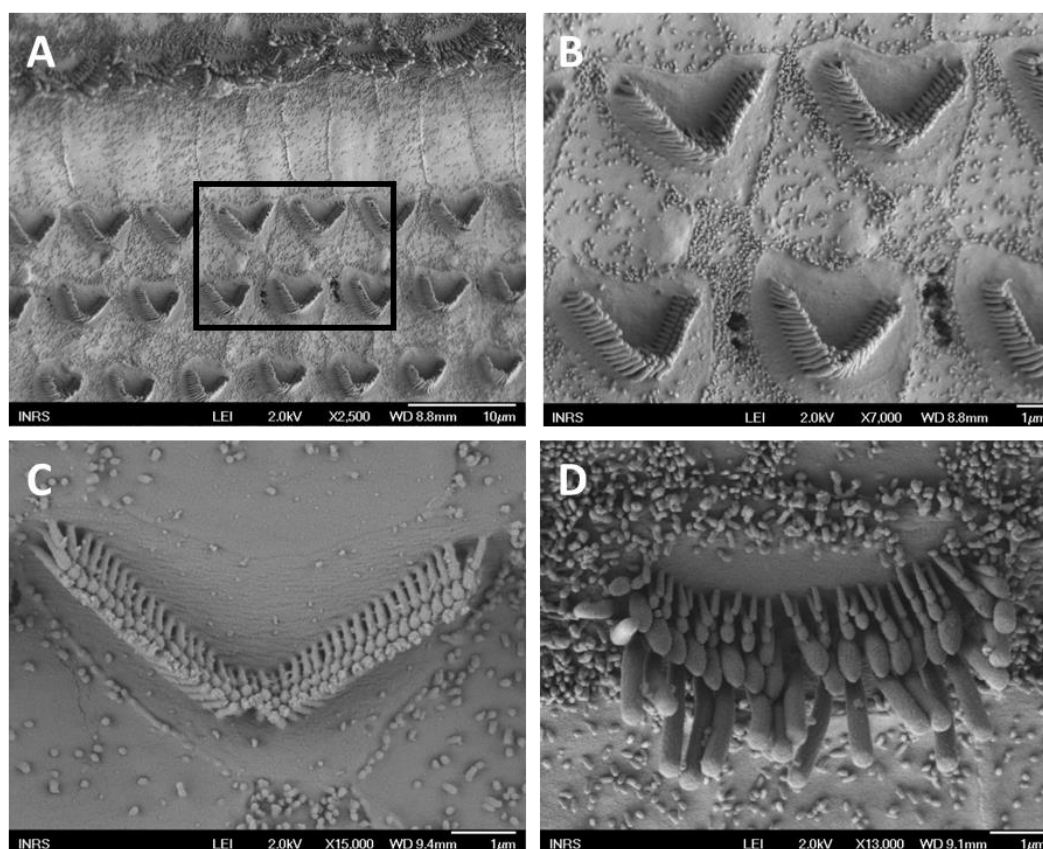
L'anàlisi *post-hoc* va assenyalar una gran diferència entre les amplituds dels PDA obtinguts amb la co-exposició al soroll impulsu + 250 ppm de CS<sub>2</sub> i els altres grups (Fig. R50). La combinació de l'exposició a CS<sub>2</sub> i soroll impulsu va incrementar significativament les diferències en l'amplitud del PDA ( $-59,8 \pm 6,1$  dB) respecte a l'exposició al soroll impulsu sol [ $F(1,15) = 16,57$ ;  $p = 0,0011$ ]. Finalment, encara que no trobem una diferència significativa entre el soroll continu i soroll continu juntament amb CS<sub>2</sub> [ $F(1,15) = 1,2$ ;  $p = 0,2928$ ], les dades mostrades a la Figura R50 suggereixen si de cas una tendència a la reducció de la pèrdua auditiva quan s'afegeix el solvent.. Finalment, la major diferència estadísticament significativa la trobem entre ambdós grups d'animals co-exposats [ $F(1,15) = 32,7$ ;  $p = 0,0001$ ].

### 5.4.3 Anàlisis histològiques

#### 5.4.3.1 Microscòpia electrònica de rastreig: estat dels estereocilis

Al final dels 5 dies d'exposició, es van examinar les **característiques ultraestructurals de l'òrgan de Corti a través del microscopi electrònic de rastreig**.

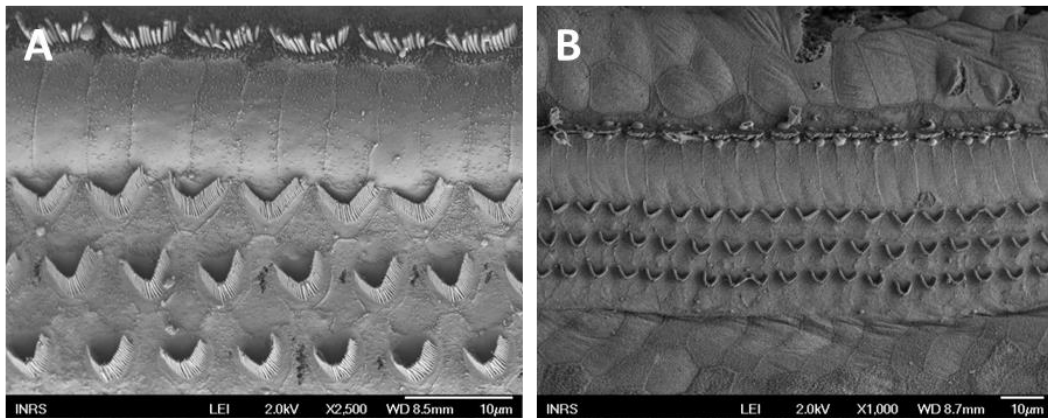
Aquestes observacions histològiques de l'epiteli sensorial confirmava que els espècimens control d'aquest estudi ( $n = 9$ ) tenien les mateixes característiques morfològiques que les rates adultes normals descrites a la literatura (Robles and Ruggero, 2001). Entre les característiques destaquen: feixos ciliars intactes emergint des de la placa cuticular cap la superfície apical de les cèl·lules ciliades, abundants microvellositats a la superfície apical de les cèl·lules de suport i no hi ha pèrdua significativa de cèl·lules ciliades (Fig. R51).



**Figura R51.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals control observats al final del període d'exposició. (A) Vista general de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis (X2500). (B) Ampliació dels feixos ciliars intactes i les microvellositats de les cèl·lules de suport de la primera i segona fila de cèl·lules ciliades externes observats a aproximadament 9 kHz (X7000). (C) Cèl·lula ciliada externa (X15000). (D) Cèl·lula ciliada interna (X13000).

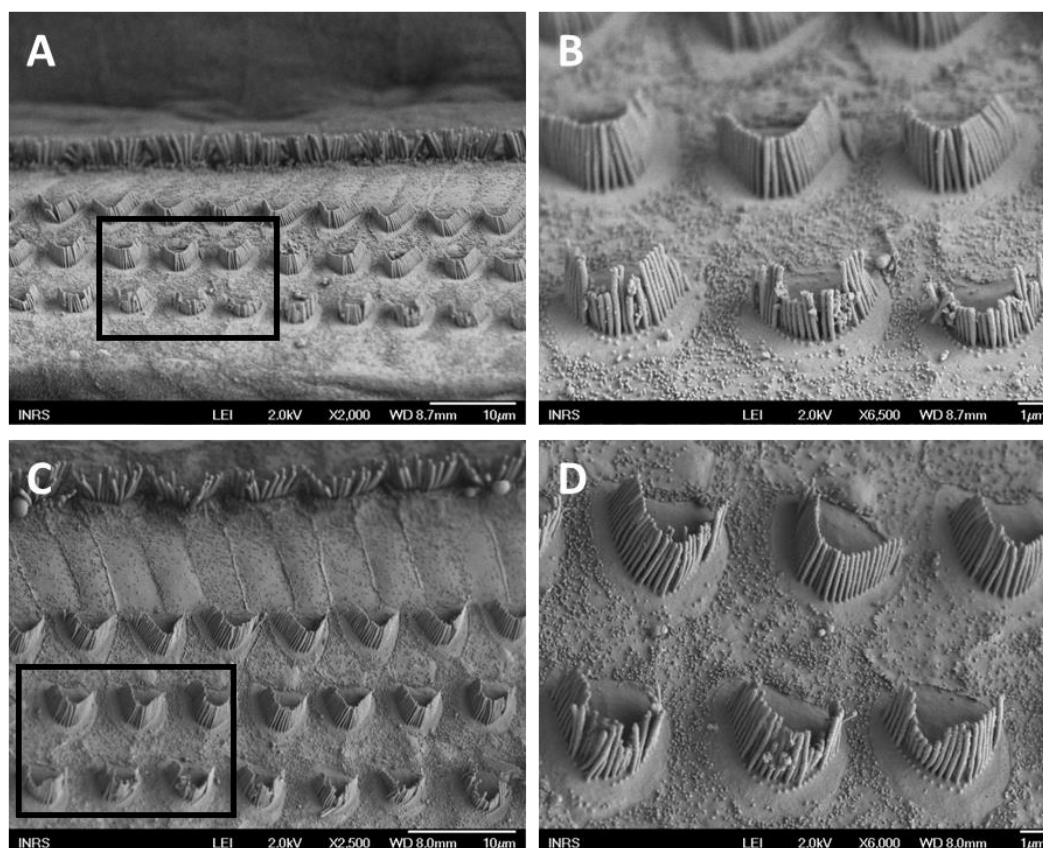
L'exposició al soroll i/o a alguns solvents (n = 3/grup), pot produir danys mecànics sobre els **estereocilis**, sobretot els sorolls impulsius (Husbands et al., 1999; Zhao et al., 1996), la qual cosa es pot veure immediatament després de l'exposició i pot ser reversible o no, depenent del grau de dany (Wang et al., 2002). Igualment, una exposició al soroll i/o als solvents condueix a la **pèrdua de cèl·lules ciliades** causada per la mort cel·lular.

L'exposició al **soroll continu**, tant sol com amb el solvent, no va causar cap dany a nivell dels estereocilis ni cap pèrdua evident de cèl·lules ciliades (Fig. R52). Aquestes mostres eren comparables amb les mostres control.



**Figura R52.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals exposats al soroll continu amb o sense disulfur de carboni observats al final del període d'exposició. (A) Exposició al soroll continu sol: vista de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis observats a aproximadament 11 kHz (X2500). (B) Exposició al soroll continu + disulfur de carboni: vista de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis observats a aproximadament 10 kHz (X1000).

Contràriament, en rates exposades al **soroll impulsiu** es van observar estereocilis trencats, fins i tot alguns d'ells van ser arrencats de les plaques cuticulars a nivell de la tercera fila de CCE (Fig. R53A-B). Els estereocilis malmesos es troben en les regions que corresponen a les freqüències més danyades, en l'àrea tonotòpica entre 4 a 20 kHz aproximadament. Així i tot, no es va observar una evident pèrdua de cèl·lules ciliades. Observacions similars es van fer en el grup exposat a **soroll impulsiu més CS<sub>2</sub>**; dany als estereocilis de la tercera fila de CCE (Fig. R53C-D).



**Figura R53.** Microscòpia electrònica de rastreig dels òrgans de Corti d'animals exposats al soroll impulsiu amb o sense disulfur de carboni observats al final del període d'exposició. (A-B) Exposició al soroll impulsiu sol: (A) Vista general de l'organització de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis (X2000) i (B) ampliació dels feixos ciliars danyats de la tercera fila de cèl·lules ciliades externes observats a aproximadament 8 kHz (X6000). (C-D) Exposició al soroll impulsiu i disulfur de carboni: (C) Vista general de les cèl·lules ciliades i els seus estereocilis (X2500) i (D) ampliació dels feixos ciliars danyats de la tercera fila de cèl·lules ciliades externes observats a aproximadament 9 kHz (X6500).

### 5.4.3.2 Cocleograma

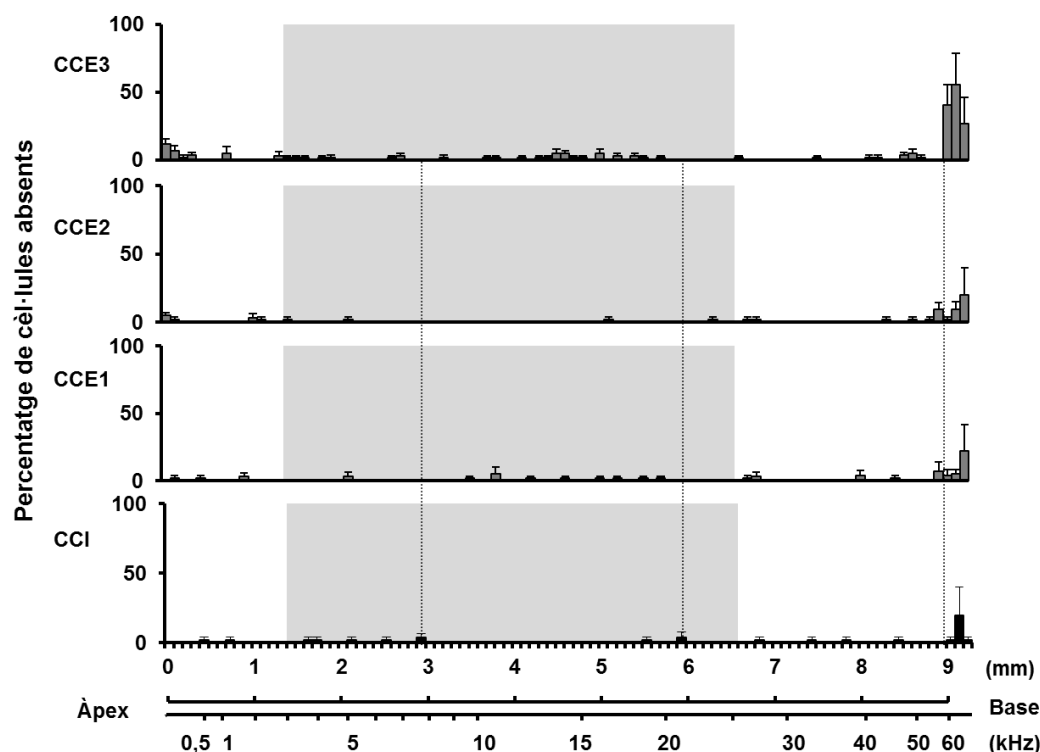
Després d'un període de recuperació de 10 setmanes, es va fer un **recompte de les cèl·lules ciliades a través del microscopi òptic** per tal de plasmar el percentatge de pèrdua cel·lular.

En el grup **control** ( $n = 10$ ), la pèrdua mitjana de CCI i CCE de la primera fila mai sobrepassava l'1 %, i en la segona i tercera fila es trobava entre un 1 i un 3 % de pèrdua de cèl·lules (Taula R3).

Grup	% CCI	% CCE1	% CCE2	% CCE3
SC	0,31	0,97	1,13	3,39
SC+CS <sub>2</sub>	0,8	0,73	1,22	2,58
SI	0,61	0,7	1,52	3,23
SI+CS <sub>2</sub>	0,47	1,71	2,76	9,16
CS <sub>2</sub>	0,31	0,97	1,13	3,39
Controls	0,32	0,89	1,05	2,75

**Taula R3.** Percentatge de pèrdua cel·lular en cada una de les files de cèl·lules de l'òrgan de Corti i en cada un dels grups exposats i el grup control. CS<sub>2</sub>: 250 ppm de disulfur de carboni (15min/h). SC: soroll continu. SI: soroll impulsiu. CCI: cèl·lules ciliades internes. CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes. CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes. CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes.

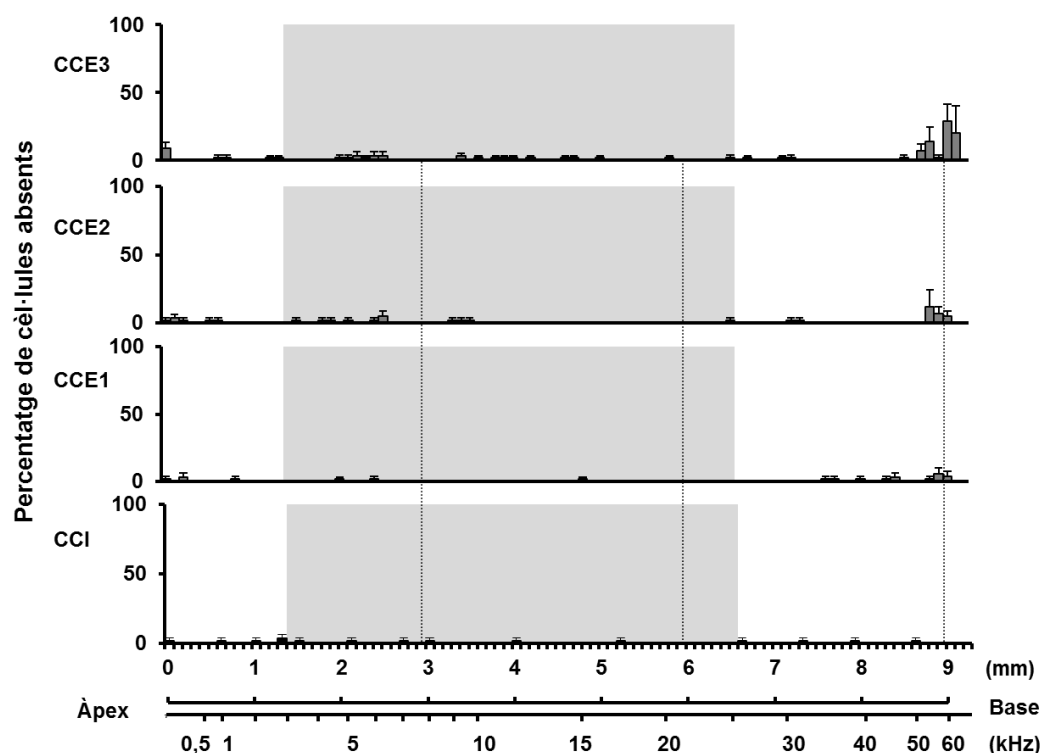
El cocleograma obtingut amb la mitjana de 5 rates control es mostra a la Figura R54, on es pot observar la presència de casi totes les cèl·lules ciliades. Tal i com s'explica a l'apartat 5.2.2.3, l'absència d'algunes CCE a la base de la còclea és un fet normal.



**Figura R54.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates controls 10 setmanes després del final de l'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

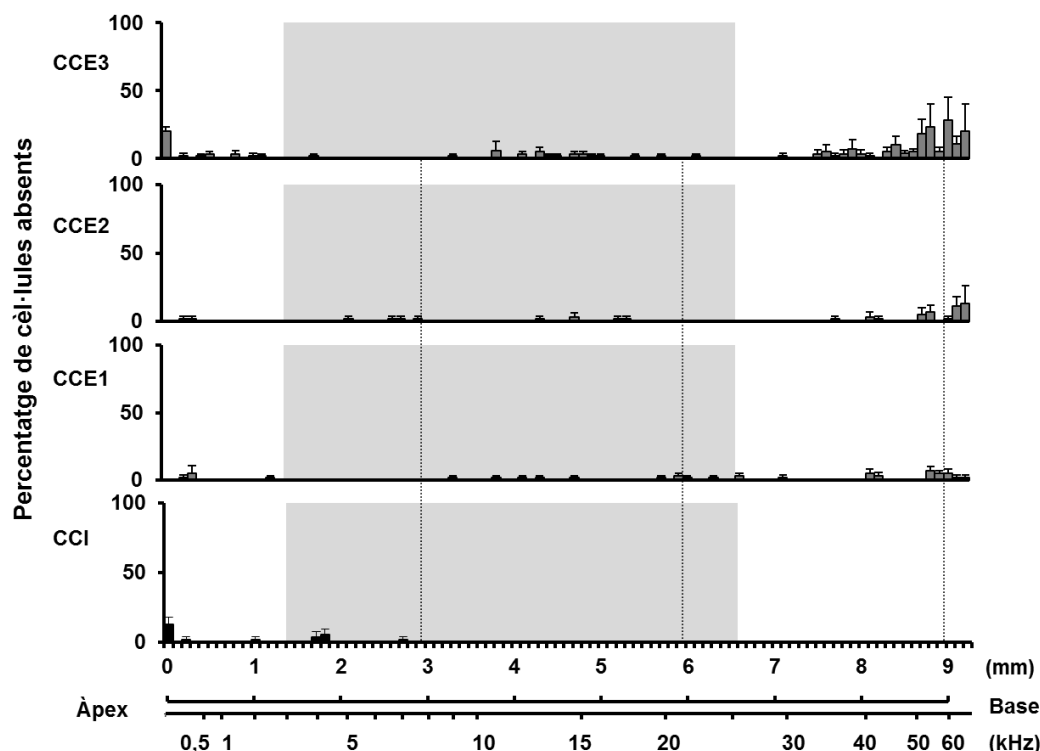
Es sap que l'exposició al soroll i/o a alguns solvents pot produir diferents danys sobre les cèl·lules ciliades que poden conduir a la mort i, per tant, a la **pèrdua d'aquestes cèl·lules**.

El cocleograma obtingut amb la mitjana de 5 rates exposades a CS<sub>2</sub> sol (Fig. R55) era similar a l'obtingut per les rates control (Fig. R54). No trobem diferències significatives en la pèrdua de CCI ni CCE entre el grups control i el grup exposats al solvent. El percentatge de pèrdua de cada una de les files molt similar a l'obtingut en els controls (Taula R3).

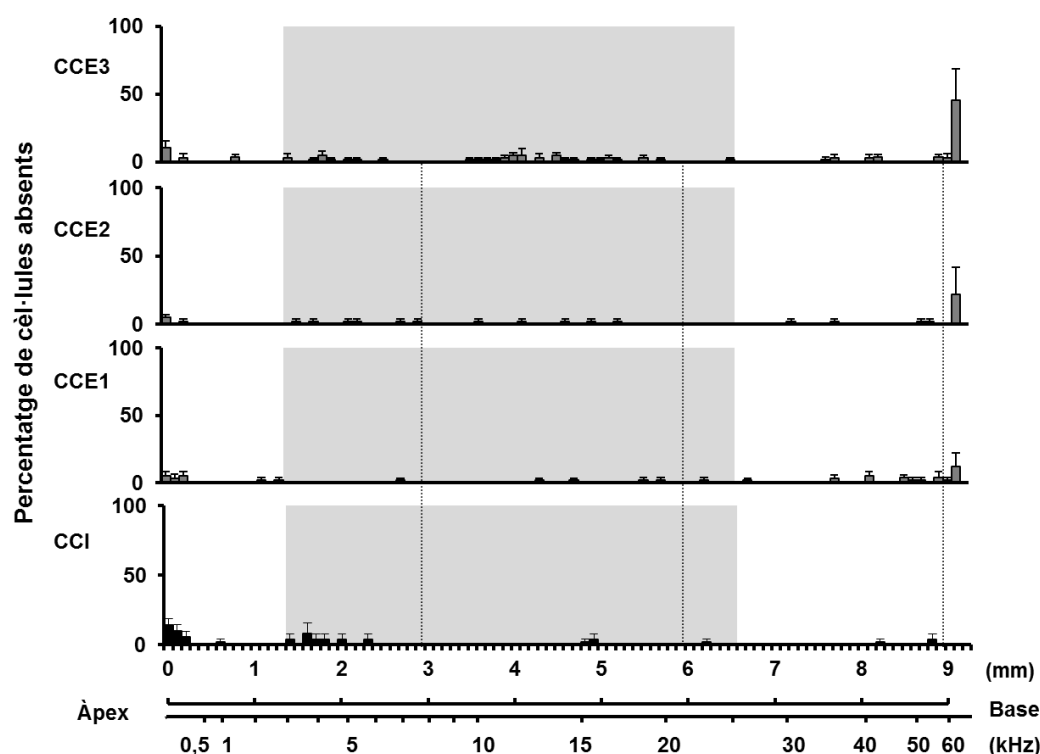


**Figura R55.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates exposades al disulfur de carboni 10 setmanes després del període d'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

L'exposició al **soroll continu**, tant **sol** (Fig. R56) com amb el **CS<sub>2</sub>** (Fig. R57), va donar com a resultat uns cocleogrames similars al del grup control. Igualment, a ambdós grups vàrem trobar una pèrdua mitjana menor que 1 % en les CCI i les CCE de la primera fila, i una pèrdua entre 1 i 3,4 % per la segona i tercera fila de CCE (Taula R3). Tot i que la pèrdua d'audició induïda pel soroll continu, tant amb CS<sub>2</sub> com sol, va ser significativa, no hi havia una pèrdua cel·lular visible en els cocleogrames després del període de recuperació. No trobem diferències significatives en cap de les 4 files de cèl·lules ciliades entre el grups control i els grups exposats a soroll continu, amb o sense solvent.

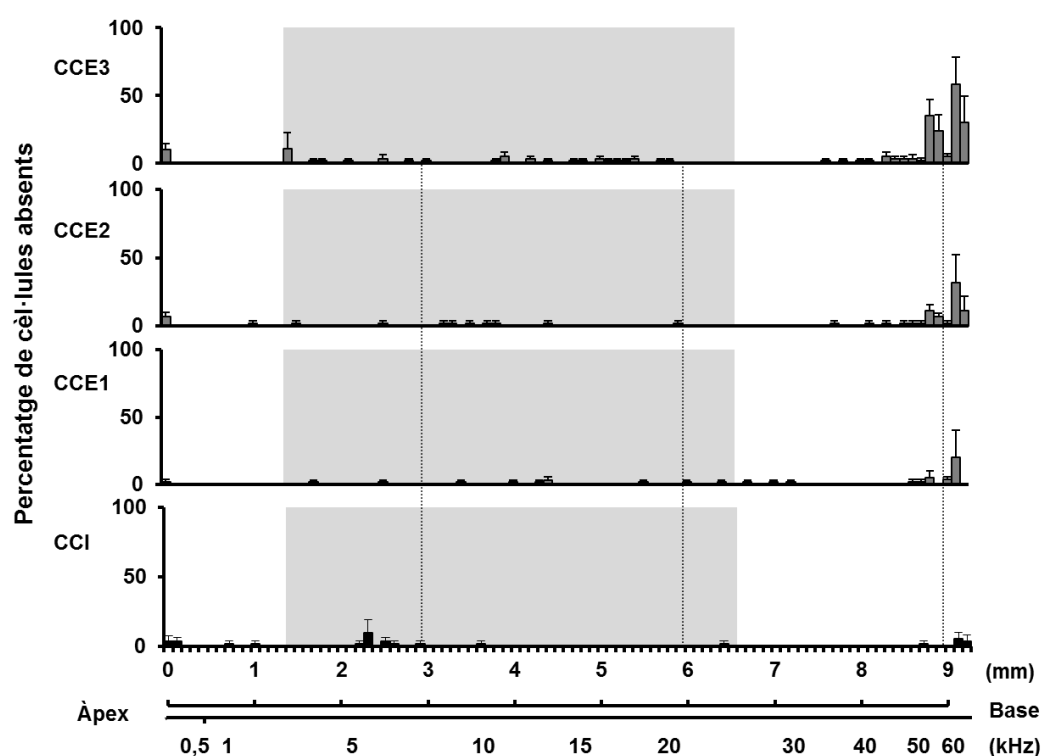


**Figura R56.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates exposades al soroll continu 10 setmanes després del període d'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.



**Figura R57.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates co-exposades al soroll continu i disulfur de carboni 10 setmanes després del període d'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

Igualment, el **soroll impulsiu** va provocar una pèrdua cel·lular similar a l'obtinguda amb l'exposició al soroll continu i, per tant, similar al grup control (Taula R3). Així doncs, no trobem diferències significatives en el nombre de cèl·lules en l'òrgan de Corti entre animals controls i animals exposats al soroll impulsiu. Igual que el soroll continu, el soroll impulsiu no va alterar de manera visible el cocleograma, encara que ambdós grups presentessin una pèrdua auditiva significativa, mesurada a través dels PDA (Fig. R58).



**Figura R58.** Mitjana dels cocleogrames ( $n = 5$ ) de rates exposades al soroll impulsiu amb una  $L_{EX,8h}$  de 84 dB SPL 6 h/dia durant 5 dies consecutius 10 setmanes després del període d'exposició. Eix x: la línia superior representa la distància (mm) al llarg de l'espiral que forma l'òrgan de Corti, la línia inferior representa el mapa de freqüències. Eix Y: percentatge de pèrdua de cèl·lules ciliades. CCI: cèl·lules ciliades internes, CCE1: primera fila de cèl·lules ciliades externes, CCE2: segona fila de cèl·lules ciliades externes, CCE3: tercera fila de cèl·lules ciliades externes. L'àrea grisa indica el rang de freqüències mesurades a través dels productes de distorsió acústics. Els valors corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM.

Contràriament, la combinació de **CS<sub>2</sub> amb soroll impulsiu** va provocar una pèrdua de CCE estadísticament significativa a nivell de la tercera [ $F(1,9) = 26,71$ ;  $p < 0,001$ ] i segona fila [ $F(1,9) = 22,39$ ;  $p = 0,0015$ ] entre el grup exposat ( $n = 5$ ) i el grup control (Taula R3). Així i tot, l'augment en la pèrdua cel·lular es va començar a apreciar en la primera fila de CCE, encara que no sigui significatiu. Com s'il·lustra en la Figura R60, una gran proporció de la pèrdua de CCE de la tercera fila (28 %) estava situat a la regió que correspon a la freqüència entre 8 i 13 kHz.





## **6 . DISCUSSIÓ**



## 6.1 Efecte de la co-exposició al soroll ric en baixes freqüències i al CS<sub>2</sub>

Els resultats d'aquest estudi van mostrar que el soroll, l'espectre del qual es trobava sobre tres bandes d'octava (de 0,35 a 2,8 kHz), va generar una pèrdua auditiva significativa entre la freqüència mesurable més baixa, 3,6 kHz, i 6 kHz. Segons dades de la literatura, un soroll de freqüències mitjanes produeix una pèrdua auditiva fins a mitja octava per sobre de l'espectre del soroll generat (Campo et al., 2011; McFadden, 1986). La pèrdua obtinguda per aquest soroll ric en baixes freqüències es va estendre a més d'una octava per sobre de l'espectre del soroll generat, per tant, era un traumatisme més ampli del que s'esperava. Després d'un període de recuperació de 4 setmanes, la finestra de freqüències danyada era idèntica, encara que la magnitud de la pèrdua auditiva va disminuir al voltant de 5 dB. Així doncs, ens trobem davant d'una recuperació parcial de la capacitat auditiva perifèrica. Sorprenentment, aquesta pèrdua auditiva no es va poder associar amb cap dany histopatològic. No es va observar pèrdua de cèl·lules ciliades i els estereocilis tenien un aspecte normal. Igualment, la densitat i característiques morfològiques dels cossos cel·lulars de les cèl·lules ciliades i de les neurones ganglionars eren idèntiques per les rates control i les rates exposades, per qualsevol grup d'exposició. Tampoc es va observar alteració de les terminals aferents, ni signes de dilatació dels botons que indiquessin una excitotoxicitat glutamatèrgica, ni alteracions en els neurofilaments que indiquessin la retracció de les aferents o una axonopatia neurofilamentosa.

El PDA és un indicador de la funció global de les CCE (Avan et al., 2001). Ja que no es va trobar cap canvi histològic per explicar els efectes mesurats amb els PDA, s'han considerat diferents hipòtesis per explicar aquests resultats. En primer lloc, a nivell perifèric s'ha pogut produir una ruptura mecànica entre la membrana tectorial i els estereocilis (Zwislocki, 1984) o una modificació de la rigidesa dels estereocilis que podria afectar el procés mecanosensorial de la transducció a nivell de les CCE (Liberman and Dodds, 1987). Per altra banda, una disfunció del control eferent de les CCE podria causar una reorganització sinàptica a nivell de les cèl·lules ciliades (Liberman and Kujawa, 2017). En ambdós casos, el nombre de nuclis cel·lulars i fibres romandria inalterat, tot i la ineficàcia del sistema auditiu perifèric. Cal considerar també la possibilitat que hi hagi una lesió subtil que hagi escapat a la detecció amb els medis emprats, i que requerís una anàlisi més profunda per a ser detectada, per exemple, emprant microscòpia electrònica de transmissió o altres marcadors per a l'anàlisi de terminals per immunofluorescència.

Després de l'exposició al soroll juntament amb el CS<sub>2</sub>, s'ha pogut observar que aquest solvent potencia els efectes del soroll de baixa freqüència sobre l'audició augmentant el rang de freqüències afectades, i a la vegada disminuint l'amplitud de la pèrdua auditiva dins la gamma de freqüències ja alterades pel soroll.

Així doncs, en primer lloc, es va observar que en els animals co-exposats s'augmentava la finestra de freqüències danyades fins a 9,6 kHz. És lògic que les freqüències danyades pel CS<sub>2</sub> siguin veïnes de les freqüències danyades pel soroll (9,6 kHz vs. 6 kHz). No obstant, al final del període de recuperació, la gamma de freqüències impactada era idèntica al grup d'animals exposats al soroll sol, és a dir, fins a 6 kHz. Per tant, aquest allargament de la finestra de freqüències afectades per l'exposició al CS<sub>2</sub> és un fenomen temporal i no sembla generar dèficits auditius complementaris permanents. La pèrdua auditiva temporal a causa de l'exposició al CS<sub>2</sub> ja ha estat descrita en la literatura, tant en rates com en humans (Hirata et al., 1992a i 1992b). A més, contràriament als solvents aromàtics, no es coneixen ni s'han trobat en aquest estudi efectes cocleotòxics del CS<sub>2</sub>, de manera que és probable que aquest solvent causi una pèrdua auditiva retrococlear (Hodgkinson and Prasher, 2006; Vyskocil et al., 2012). Així doncs, aquesta extensió de la finestra de freqüències afectada es podria explicar per un efecte central del CS<sub>2</sub>, concretament sobre les vies eferents que controlen les cèl·lules ciliades.

D'altra banda, al final del període d'exposició, les pèrdues auditives dels animals co-exposats eren més febles entre 3,6 i 6 kHz que els animals exposats al soroll sol. Aquesta observació pot semblar sorprenent i inesperada però es sap que, en el cas d'altres solvents, concentracions moderades poden tenir un efecte neuroactiu que preval per sobre dels seus efectes cocleotòxics (Campo et al., 2014). Aquest efecte neuroactiu consisteix en una disminució significativa del llindar necessari per activar el ROM, el qual té com a principal funció reduir l'energia acústica que arriba a la còclea. Aquest possible efecte es discuteix en detall més endavant.

La toxicitat del CS<sub>2</sub> sol o associat al soroll ric en baixes freqüències sobre el sistema vestibular es va avaluar estudiant el reflex vestibular per la mesura del NPR. L'avaluació fisiològica té un paper important en l'estudi de la toxicitat sensorial. Les dades fisiològiques dels estudis en animals sovint es poden comparar amb dades humanes obtingudes amb el mateix mètode analític, proporcionant un pont entre els dèficits en els sistemes sensorials humans i les observacions histològiques i moleculars que, lògicament, sols es poden obtenir en models animals. En el cas del sistema vestibular, la comparació entre l'animal i l'ésser humà es veu afavorida per la conservació evolutiva d'aquest sistema (Day and Fitzpatrick, 2005). Tanmateix, com bé s'explica en el treball de Llorens et al., 2018, l'avaluació del sistema vestibular presenta per si mateixa diverses dificultats que fan que la tasca presenti no pocs entrebancs.

La mesura del RVO es considera una eina adequada per estudiar les possibles alteracions induïdes per compostos tòxics, tant en animals com en humans, ja que la pertorbació d'aquest reflex pot ser una manifestació primerenca de l'acció d'aquests compostos sobre les funcions nervioses sensorials i/o motores, fins i tot en absència d'evidents signes clínics. A més, l'anàlisi del RVO ens ajuda a avaluar la funció de les estructures nervioses centrals i perifèriques involucrades en la generació i el control de la resposta (Cohen, 1984; Moschovakis, 1997; Pompeiano, 2006). Així i tot, en toxicologia industrial, pocs estudis s'han centrat en la toxicitat dels productes utilitzats (solvents, metalls...) sobre el sistema vestibular a través de la mesura del RVO (Niklasson et al., 1993; Nylén et al., 1991; Tham et al., 1982) i són estranys els que han utilitzat la mesura del NPR (Larsby et al., 1986; Mameli et al., 2006, 2001).

El RVO que genera l'estimulació rotacional depèn del desplaçament de l'endolimfa que es mou per inèrcia respecte les cèl·lules ciliades de l'epiteli vestibular que giren amb el cos. Després d'un curt període de temps, l'endolimfa girarà a la mateixa velocitat que la resta del cos, però mantindrà aquest moviment inercial si la rotació del cos s'acaba de manera abrupta. Això provocarà l'estimulació de les cèl·lules ciliades, generant així un NPR en el sentit contrari al sentit de l'estimulació. Per tant, l'avaluació quantitativa d'aquest NPR (durada, freqüència, etc.) s'ha utilitzat per avaluar el sistema vestibular.

A més, aquestes mesures funcionals s'han completat amb tests del comportament, anàlisis histològics i l'anàlisi de l'expressió de gens de neurotoxicitat.

Els resultats d'aquest estudi, a través de l'anàlisi del RVO, mostren que una concentració de 250 ppm de CS<sub>2</sub> pot afectar l'equilibri. Hi ha una disminució de la durada i el número de sacades. Quan s'acaba la rotació de l'animal, tenim l'efecte de l'endolimfa sobre la cúpula, que suposem que serà equivalent en tots els grups, sense una alteració pel CS<sub>2</sub>. Per tant, si la durada del nistagme és menor amb un número de sacades menor, vol dir que una determinada intensitat d'estímul sobre les crestes és capaç de generar sacades en els animals controls però no en els tractats. És a dir, hi ha un increment del llindar, de la magnitud de l'estímul mínim necessari per generar el nistagme en animals co-exposats en comparació amb els controls. Aquests efectes observats a nivell del NPR són temporals ja que 4 setmanes després de l'exposició, els paràmetres no presentaven diferències significatives respecte els valors inicials, encara que no s'havien arribat completament a aquests. Aquesta recuperació dels valors basals pot ser deguda a mecanismes robustos de compensació central que actuen a nivell de les neurones dels nuclis vestibulars (Darlington et al., 2002; Straka et al., 2005).

Ja s'ha vist en molts estudis anteriors que el RVO es troba afectat per diferents tipus de solvents o medicaments, confirmant així que el sistema vestibular i les altres estructures involucrades en aquest reflex, esdevenen una diana sensible per aquests compostos. En general, els hidrocarburs al·logènics saturats causen un efecte depressiu sobre el RVO, mentre que els compostos insaturats o els compostos benzènics causen una excitació (Odkvist et al., 1985). Com exemples podem destacar els estudis sobre l'estirè, el toluè, el tricloroetilè i el tricloroetà en rates (Larsby et al., 1986; Niklasson et al., 1993; Tham et al., 1982), l'exposició de rates a metalls com el plom o l'alumini (Mameli et al., 2001, 2006), o l'exposició d'animals a diferents medicaments com la fenitoïna o el cisplatí (Mameli et al., 1986; Takimoto et al., 2016).

A part, podem parlar d'un efecte de co-exposició sobre el RVO ja que el CS<sub>2</sub> sol presenta menors canvis sobre els paràmetres analitzats del NPR que en presència del soroll.

Estudis fisiològics en humans i animals demostren que els sons tenen la capacitat d'estimular el sistema vestibular (Cazals et al., 1982; Halmagyi et al., 2005). Així doncs, l'exposició al soroll no només produeix pèrdua auditiva, sinó que també pot produir danys substancials en el sistema vestibular perifèric. La proximitat anatòmica del laberint vestibular i el sistema acústic, la semblança de l'estructura de les cèl·lules ciliades d'ambdós sistemes, l'artèria comú i els mateixos líquids intralaberíntics, donen suport a aquesta possibilitat de trobar un dany vestibular associat a la pèrdua auditiva per exposició al soroll.

Com en la còclea, la vulnerabilitat del vestíbul a l'exposició sonora depèn de diferents factors com el temps d'exposició, la intensitat, la durada, la freqüència i l'estat de les orelles (Perez et

al., 2002; Tamura et al., 2012). S'ha provat que l'epiteli més exposat al soroll és el sàcul (Cassandro et al., 2003; Cazals et al., 1983; McCabe and Lawrence, 1958), sobretot els sorolls de baixa freqüència (Jones et al., 2010; Stewart et al., 2017), ara bé, alguns treballs actuals parlen de l'estimulació del conjunt dels cinc òrgans vestibulars, encara que hi hagi diferències entre ells (Stewart et al., 2016; Zhu et al., 2014, 2011).

Es sap que el soroll continu és capaç d'induir dany metabòlic amb una generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) relacionades amb el mecanisme isquèmic, l'excitotoxicitat glutamatèrgica i la reducció del sistema antioxidant endogen que condueixen a un dany mitocondrial, peroxidació de lípids de membrana, i l'alliberament de factors pro-apoptòtics que condueixen a la mort cel·lular en el vestíbul (Fetoni et al., 2009). Per exemple, en ratolins exposats al soroll ric en baixes freqüències s'ha observat una disminució del número de cèl·lules ciliades vestibulars, conduint a un deteriorament de l'equilibri (Tamura et al., 2012). Però, en el nostre cas, no tenim modificacions morfològiques a nivell perifèric i, ja que es sap que el soroll actua principalment a nivell perifèric, podem pensar que aquest és capaç de pertorbar els paràmetres del NPR modificant el flux de l'endolimfa que es troba en contacte tant amb la còclea com amb el sistema vestibular. S'ha demostrat que els sons de baixa freqüència causen un augment transitori del volum del líquid endolimfàtic (Flock and Flock, 2000; Salt, 2004). Aquest volum torna ràpidament als valors basals gràcies als mecanismes homeostàtics basals (Salt, 2004). El mecanisme subjacent a aquest canvi de volum a causa del soroll encara no s'ha establert (Salt and Hullar, 2010). Així doncs, podem pensar que el soroll pot causar canvis sobre el volum l'endolimfa i, per tant, afectar el sistema vestibular de manera transitòria.

A més del NPR, els resultats mostren que no hi ha cap canvi significatiu dels tests de comportament específics del sistema vestibular en animals co-exposats. Els animals amb dèficits vestibulars evidents, sobretot a nivell perifèric, mostren una anormalitat dels reflexos vestibulars. Tant en el test del *air-righting reflex*, com el test del *tail-lift reflex* (Llorens et al., 1993b; Ossenkopp et al., 1990), es veu clarament la dependència d'aquests reflexos al sistema vestibular. Al contrari, s'han trobat canvis significatius en el patró de marxa dels animals co-exposats respecte els seus valors basals al final de l'exposició. Aquesta diferència entre els reflexos i el patró de marxa indica que l'efecte de la co-exposició sobre el patró de marxa probablement no depèn d'un efecte sobre el sistema vestibular. Hi ha abundants dades que mostren que hi ha tests de la funció motora que són sensibles, però no específics del sistema vestibular (Boadas-Vaello et al., 2005; Boadas-Vaello et al., 2017).



Les dades d'aquest estudi no ens permeten conèixer de manera precisa el lloc d'origen de les pertorbacions observades sobre la funció vestibular. És per això que l'absència de canvis en els tests comportamentals específics del sistema vestibular i la manca d'evidents modificacions histològiques dels receptors sensorials perifèrics, ens fa pensar en un canvi a nivell central, com ja s'ha deduït en altres experiments que analitzen l'impacte d'exposicions al CS<sub>2</sub> sobre el sistema vestibular, i també pel que s'ha vist sobre el sistema auditiu en aquests mateix estudi (Kowalska et al., 2000; Sułkowski et al., 1992).

Les anàlisis efectuades a nivell del cerebel dels animals co-exposats a 250 ppm de CS<sub>2</sub> i soroll mostren una sobre-expressió moderada de *Cideb* i *Trpm1*, sobre un total de 86 gens explorats. El *Trpm1* és un gen que codifica per un canal catiònic permeable al calci. Les propietats funcionals dels canals TRPM tenen un gran efecte sobre la regulació de la homeòstasis iònica ja que controlen de manera directe el flux de Ca<sup>2+</sup> i determinen el potencial de membrana de la cèl·lula. El TRPM1 és un canal activat de manera espontània, que disminueix la retirada del Ca<sup>2+</sup> intracel·lular i augmenta la seva readmissió (Fleig and Penner, 2004, Kraft and Harteneck, 2005). Així doncs, una sobre-expressió d'aquest canal pot provocar un augment considerable del calci intracel·lular i, per tant, una augmentació del llindar d'excitació de la cèl·lula. Els nivells cel·lulars d'aquest canal són generalment baixos, la seva expressió sols sobresurt al cervell, tant en humans (Fonfria et al., 2006), com en ratolins (Jang et al., 2012). La família de gens *Cide* codifiquen proteïnes amb la capacitat d'activar l'apoptosi en mamífers (Inohara et al., 1998). La proteïna CIDEB juga un paper important en el metabolisme energètic i el manteniment de la homeòstasis lipídica, la qual cosa fa que el teixit amb un nivell d'expressió més elevat sigui el fetge (Xu et al., 2012; Yonezawa et al., 2011). Es va veure que l'expressió de *Cideb* era coherent amb l'apoptosi neuronal observada després d'una lesió nerviosa (Wang et al., 2006).

Després d'haver observat la sobre-expressió d'aquest dos gens podríem pensar que les neurones del cerebel dels animals co-exposats poden tenir un possible augment del llindar d'excitació i un increment de l'apoptosi. Ara bé, la manca de resposta en la pràctica totalitat dels 86 gens del panell analitzat permet excloure que el cerebel dels animals exposats hi hagués apoptosi, canvis sobre el desenvolupament neuronal, estrès oxidatiu, autofàgia, una divisió cel·lular i proliferació anormal, alteracions en els transportadors iònics, canvis evidents en l'estructura cel·lular i en la senyalització entre cèl·lules i, fins i tot, una inflamació o immunoregulació.

En realitat, aquests resultats no ens permeten concloure en una presència de signes majors de neurotoxicitat després d'una exposició a 250 ppm de CS<sub>2</sub> durant 4 setmanes. És difícil saber el lloc i el mecanisme d'acció precís del neurotòxic sobre el sistema vestibular amb aquest disseny experimental.

Es sap que els solvents poden causar disfuncions sobre SNC, especialment sobre el cerebel (Lockitch, 1993; Odkvist et al., 1985). El mecanisme d'emmagatzematge de la velocitat (*velocity storage*, en anglès) és la responsable del NPR, és l'explicació per la qual continua el moviment dels ulls quan l'estímul als òrgans perifèrics ja ha acabat. Aquesta velocitat i altres elements del RVO poden ser modificats i controlats per estímuls inhibitoris provinents del cerebel, mitjançant les cèl·lules de Purkinje, a través del neurotransmissor GABA (Baumann et al., 2015; Highstein et al., 2005; Precht, 1979). Per tant, la pertorbació de la transmissió de GABA pot causar canvis importants en la funció vestibular.

Un compost tòxic pot actuar sobre la funció dels canals iònics, la neurotransmissió i la despolarització de la membrana. La disminució de la freqüència del NPR (la qual cosa depèn del nombre de sacades i la durada total), ens fa deduir un dany sobre les estructures del SNC implicades en el RVO. Podem pensar que el tòxic danya la funció central del RVO a causa de l'augment de l'activitat dels neurotransmissors inhibitoris i la interrupció dels sistemes colinèrgic i noradrenèrgic de la neurotransmissió com ja es va deduir en l'estudi de Mameli et al., 2006, en el qual, la intoxicació de rates per clorur d'alumini tenia unes reduccions en els paràmetres del NPR comparables al nostre estudi.

Així doncs, podem suposar que s'ha produït una modificació neuroquímica temporal de les vies centrals que controlen el RVO.

Dins les nostres condicions experimentals, podem dir que el CS<sub>2</sub> no és un agent ototòxic, però, a causa del seu efecte sobre el SNC, té la capacitat d'alterar els sistemes auditiu i vestibular. Aquesta teoria confirma els resultats obtinguts per Clerici and Fechter, 1991, els quals no van observar cap efecte significatiu en els llimdars acústics de rates exposades durant 12 setmanes a 500 ppm de CS<sub>2</sub> sol, suggerint doncs, que l'ototoxicitat primària del CS<sub>2</sub> es dona sols quan aquest es troba juntament amb soroll. Així doncs, aquest solvent pot agreujar els efectes temporals del soroll sobre el sistema auditiu (extensió de les pèrdues de PDA cap a les freqüències elevades) i alterar el sistema vestibular provocant una disminució més accentuada dels paràmetres del NPR. No obstant això, en el present estudi, l'exposició al CS<sub>2</sub> sols té una durada de 4 setmanes a una concentració de 250 ppm, la qual cosa és un temps

relativament curt i una dosi de solvent baixa si es compara amb altres estudis sobre la neurotoxicitat del CS<sub>2</sub>. En el cas d'una exposició més llarga, l'efecte pot ser permanent.

Tots aquests efectes aproven els resultats obtinguts per Morata, 1989, on els treballadors co-exposats al solvent (uns 30 ppm) i al soroll (86-89 dBA) van manifestar una anticipació de l'aparició de pèrdua auditiva i un augment de problemes d'equilibri, respecte als exposats al soroll sol. Així doncs, es reforça la necessitat de considerar els efectes d'una co-exposició soroll + agent químic sobre l'orella interna.

## 6.2 Efecte dosis-resposta del CS<sub>2</sub>

Després de l'exposició al soroll i/o al solvent, tots els animals presentaven un estat general saludable i no mostraven cap signe de patiment notable: no presentaven postració, ni desordres respiratoris evidents, ni signes d'agitació, però presentava un bon aspecte i els ulls estaven ben oberts (Annex 1). Però, es va trobar una disminució del pes corporal en animals exposats a dosis iguals o superiors a 250 ppm de CS<sub>2</sub>. Com és lògic, la major pèrdua de pes va ser observada amb l'exposició a 500 ppm (-5,9 g), mentre que els animals controls augmentaven el seu pes (5,2 g). La pèrdua de pes després de l'exposició a 500 ppm de CS<sub>2</sub> representa un 2,3 %, la qual es pot considerar moderada i no excedeix els valors límits. Aquestes dades es corresponen amb les dades que trobem en la bibliografia, on la pèrdua de pes causada per l'exposició al CS<sub>2</sub> ha estat ja relatada (Hirata et al., 1992; Rebert et al., 1986).

En l'estudi actual, l'exposició real de CS<sub>2</sub> va ser avaluada determinant les concentracions de CS<sub>2</sub> en la sang i les concentracions de TTCA en l'orina.

Els resultats de les anàlisis de CS<sub>2</sub> en sang mostren una clara correlació entre les concentracions sanguínies i les concentracions atmosfèriques.

El metabòlit TTCA proporciona una mesura específica i sensible de l'exposició al CS<sub>2</sub> (Campbell et al., 1985; Drexler et al., 1995). Aquest metabòlit s'utilitza com indicador biològic d'exposició professional al CS<sub>2</sub> rellevant (Thienpont et al., 1990). La concentració de TTCA també mostra una clara relació respecte la concentració atmosfèrica de CS<sub>2</sub>, ara bé, aquesta correlació no és lineal. L'augment de TTCA entre 250 i 500 ppm de CS<sub>2</sub> era sols del 12% mentre que la concentració atmosfèrica de CS<sub>2</sub> es duplicava. Contràriament, es troba un augment del 115% de TTCA entre 63 i 250 ppm de CS<sub>2</sub> per un augment 4 vegades la concentració atmosfèrica del solvent.

Aquests resultats suggereixen una saturació de la via metabòlica que conjuga el CS<sub>2</sub> quan aquest es troba en altes concentracions atmosfèriques. A més, el fort augment de concentració de CS<sub>2</sub> en sang a partir de 250 ppm ens porta a sospitar que totes les vies metabòliques d'eliminació es troben saturades, la qual cosa concorda amb observacions anteriors. Kivistö et al., 1995, va demostrar que l'excreció urinària de TTCA en rates exposades a 50 o 500 ppm de CS<sub>2</sub> durant 6 h no es trobava afectada per la inducció de diferents isoformes de citocrom P450 i l'esgotament transitori del glutatió. A més, Moorman et al., 1998, va provar que la concentració del CS<sub>2</sub> en sang en rates exposades a 500 o 800 ppm de CS<sub>2</sub> durant 13 setmanes respecte rates exposades a 50 ppm, era més alta de l'esperada per una relació directament proporcional a la dosis atmosfèrica rebuda.

Al final del període d'exposició, com s'ha vist al capítol anterior, els animals co-exposats, entre 3,6 i 6 kHz, tenien una pèrdua auditiva menor que els animals exposats al soroll sol. A més, aquests efectes neurofarmacològics eren detectables a totes les concentracions del solvent, des de 63 ppm, encara que s'observava com una tendència en aquesta concentració, fins a 500 ppm i en un gradient de dosi evident, la qual cosa no es dona en el cas de solvents cocleotòxics (Campo et al., 2014).

Igualment, a part d'aquesta disminució en l'amplitud de pèrdua de l'audició en les baixes freqüències, en aquesta part del projecte també es va observar que l'augment de la finestra de freqüències danyades fins a 9,6 kHz en els animals co-exposats també es donava de manera dosis-dependent. En l'exposició a 63 ppm de CS<sub>2</sub>, el dèficit de 2 dB en 9,6 kHz no era significatiu, tanmateix la tendència era clara. A partir de 250 ppm la diferència és clara i significativa. Així doncs, es comprova que hi ha un clar efecte dosis-resposta sobre el traumatisme auditiu que es dona en una co-exposició soroll + CS<sub>2</sub>. Aquest efecte dosis-resposta del CS<sub>2</sub> ja s'havia detectat en humans (Chang et al., 2003).

Igualment, al final del període de recuperació, la gamma de freqüències impactada en qualsevol dels grups d'animals co-exposats era idèntica als animals exposats al soroll sol, és a dir, fins a 6 kHz, confirmant així la temporalitat d'aquest fenomen, que ja s'havia comentat en l'apartat anterior.

Ja que no es troba cap canvi morfològic a nivell de la còclea ni a la dosi de 500 ppm de CS<sub>2</sub>, es reforça la hipòtesis plantejada anteriorment que es nomenava dos possibles efectes centrals d'aquest solvent, una acció neuroactiva que provoca una disminució del llindar d'activació del ROM i una influència sobre les vies eferents que controlen les cèl·lules ciliades que augmenta la gamma de freqüències amb pèrdua auditiva temporal. Això no obstant, cal de nou considerar la possibilitat que hi hagi hagut canvis perifèrics no detectables amb la nostra metodologia d'avaluació.

De la mateixa manera, amb aquest experiment s'ha confirmat que el CS<sub>2</sub> afecta l'equilibri disminuint el nombre, la durada, i la pendent d'amortiment de les sacades del NPR. Així doncs, a partir d'una exposició de 63 ppm, el solvent és capaç de pertorbar la funció vestibular, però no és suficient per provocar canvis en el comportament dels animals intoxicats ni alteracions morfològiques evidents en els receptors perifèrics (Frantík, 1970; Moser et al., 1998; Opacka et al., 1984).

Aquests efectes observats a nivell del NPR són temporals a 63 i 250 ppm ja que els valors mitjans dels paràmetres de les rates exposades a aquestes concentracions no són diferents als dels animals controls després de la recuperació de 4 setmanes. Aquest fet també corrobora les dades trobades en el capítol anterior que es va explicar com una possible modificació neuroquímica de les vies centrals d'aquest reflex.

Pel que fa a la feble alteració permanent constada a 500 ppm, podem suposar que els primers signes de lesions neurològiques poden aparèixer en aquesta dosi de CS<sub>2</sub> 6 h/dia, durant 4 setmanes. Entre aquestes lesions pot destacar la creació d'una axonopatia neurofilamentosa distal, ben descrita a la literatura per altres dosis i temps d'exposicions (Graham et al., 1995; Hodgkinson and Prasher, 2006; Llorens, 2013; Pappolla et al., 1987). Aquests canvis provoquen la disminució en la velocitat de conducció dels nervis, la qual està relacionada amb la concentració de CS<sub>2</sub> i la durada de l'exposició (Knobloch et al., 1979). La velocitat de conducció dels nervis perifèrics es pot veure completament recuperada si el període d'exposició ha estat relativament curt. Ara bé, quan aquesta es produeix durant un llarg període de temps, la neuropatia és irreparable i la reducció en la velocitat de conducció d'aquests nervis és irreversible (Knobloch et al., 1979). Aquesta teoria es pot veure's reforçada per l'estudi de Rebert et al., 1986, els quals van trobar canvis en la velocitat de conducció dels nervis de la via central auditiva amb un patró retrococlear en rates exposades al CS<sub>2</sub>, ara bé, l'exposició durava 11 setmanes.

La co-exposició del soroll amb diferents dosis de CS<sub>2</sub> pertorba ambdós sistemes, el sistema auditiu i el sistema vestibular. Al sistema auditiu aquests canvis comencen a ser significatius a partir de la dosi de 250 ppm, mentre que en el sistema vestibular comença a haver-hi modificacions a partir de 63 ppm. Aquest fet pot deure's a que el CS<sub>2</sub> té un efecte sobre el vestibul a concentracions més baixes que per l'audició o, simplement, que la sensibilitat de les mesures funcionals que s'utilitzen per analitzar cada un dels sistemes és diferent. El que és cert, és que en ambdós sistemes l'efecte dosis-resposta és evident.

### **6.3 Exposició al CS<sub>2</sub>: contínua vs. intermitent**

El CS<sub>2</sub> és ràpidament absorbit per inhalació i és distribuït ràpidament a totes les parts del cos a través de la sang. A causa de la seva naturalesa lipòfila, s'uneix fàcilment a òrgans amb alt contingut de greix com el cervell i el fetge, on és metabolitzat. La principal via d'excreció dels metabòlits de CS<sub>2</sub> és a través de l'orina.

Els resultats de l'anàlisi de la concentració de CS<sub>2</sub> sanguínia i cerebral van mostrar relació respecte les concentracions atmosfèriques. No trobem diferències significatives entre ambdós grups exposats de manera intermitent, però sí entre el grup exposat de manera contínua i els altres dos grups. Així doncs, podem deduir que 15 min d'aire pur són suficients per arribar als valors basals de càrrega de CS<sub>2</sub> sanguínia, ja que no trobem diferències entre els animals que respiren 15 min d'aire entre dos pics de solvent, i els que respiren aire pur durant 45 min abans del pròxim pic de CS<sub>2</sub>. Això concorda amb la idea de que una vegada la intoxicació acaba, el nivell de CS<sub>2</sub> lliure disminueix ràpidament; el 40% perd durant els primers 6 min i la seva completa eliminació es fa entre 5-7 h (McKenna and DiStefano, 1977a).

Aquesta idea es va confirmar amb l'anàlisi de les extraccions de sang fetes abans i després del pic de 15 min. Es va observar que 45 min després de l'exposició de 15 min a 250 ppm de CS<sub>2</sub>, la concentració del solvent ha disminuït de manera significativa, encara que segueix havent-hi una concentració important de solvent dins la sang.

A més, si es compara la concentració de CS<sub>2</sub> que es troba a la sang amb la que es troba al cervell, s'observa més solvent en la sang. Després de l'absorció, el CS<sub>2</sub> es transporta dins la sang, on incrementa de manera exponencial durant els primers 90 min d'exposició i després es manté constant (McKee, 1942). Aquest CS<sub>2</sub> es distribueix als diferents òrgans i teixits (Brieger, 1967). A causa de la seva naturalesa lipòfila, la seva distribució és major en teixits rics en lípids com el cervell. Així doncs, és lògic que el nivell de solvent sigui major en sang ja que l'extracció es fa immediatament al finalitzar la intoxicació i una gran part del solvent es troba encara al torrent sanguini. Contràriament, es sap que el nivell de CS<sub>2</sub> unit en els teixits continua augmentant després d'acabar l'exposició (McKenna and DiStefano, 1977a).

Quan es compara l'exposició de 15 min/h a 250 ppm de CS<sub>2</sub> amb l'exposició contínua a 63 ppm de CS<sub>2</sub>, les quals han rebut una mateixa dosi final, comprovem que no hi ha diferències ni en les concentracions de CS<sub>2</sub> sanguínies ni en les concentracions de TTCA urinàries. Així doncs, el patró d'exposició no influeix sobre el metabolisme i la càrrega de solvent dels animals exposats, és a dir, el grau de retenció no depèn de la concentració del tòxic com ja s'havia demostrat als anys 70 (McKenna and DiStefano, 1977a).

Respecte els efectes de la co-exposició sobre el sistema auditiu, s'ha trobat que el CS<sub>2</sub> administrat de manera intermitent no arriba a causar una prolongació de la pèrdua auditiva cap a les altes freqüències, com passa amb l'administració de 250 ppm de manera constant. Així doncs, una exposició de 15 min cada hora o cada 30 min no és suficient perquè el CS<sub>2</sub> provoqui l'extensió de freqüències afectades.

Contràriament, al final de l'exposició, la pèrdua auditiva dels animals co-exposats va ser menor que l'obtinguda en animals exposats al soroll sol, com ja es veia en els dos capítols anteriors. Però, aquest efecte era més marcat quan les exposicions al CS<sub>2</sub> eren intermitents, fent que hi hagués una diferència estadísticament significativa a 4,8 i 6 kHz entre els animals exposats al soroll sol i els animals co-exposats a 15 min/h de CS<sub>2</sub>. Com ja s'havia dit, aquest fenomen és temporal i ja s'havia descrit en la literatura per altres solvents com l'estirè, administrat a concentracions moderades (Campo et al., 2014). Així doncs, aquesta diferència significativa trobada en el grup exposat a menys dosis de solvent, reforça la teoria de l'efecte neuroactiu del CS<sub>2</sub>. Per tal d'estudiar més a fons aquest efecte, es va realitzar l'estudi amb diferents tipus de sorolls (continu o impulsu) exposant als animals a 250 ppm de CS<sub>2</sub> durant 15 min/h ja que és la dosis en la qual s'ha trobat aquest efecte estadísticament significatiu. Després de les 4 setmanes de recuperació, no trobem diferències significatives entre els 4 grups d'animals exposats. Tanmateix, per els dos grups co-exposats de manera intermitent, a 6 kHz hi ha una recuperació total de la pèrdua auditiva que s'havia enregistrat al final de l'exposició, sense diferències significatives respecte els controls. Això es deu a que ambdós grups presentaven una pèrdua menor que el grup exposat al soroll sol i el grup exposat de manera contínua, fent que, encara que els 4 grups hagin tingut una recuperació similar, els animals co-exposats de manera intermitent han arribat als valors basals dels animals controls.

En cap dels grups exposats es troben canvis en la morfologia de la còclea ni del gangli espiral, ni al final de l'exposició ni de la recuperació, reforçant la teoria de l'efecte central del solvent.

En darrer lloc, trobem un clar efecte dosis-resposta sobre el sistema vestibular, igual que s'havia trobat en el capítol anterior. A partir d'una dosis de 15 min de CS<sub>2</sub> cada 30 min l'equilibri es troba pertorbat de manera significativa. Aquests efectes observats a nivell del NPR són temporals ja que 4 setmanes després de l'exposició, els paràmetres no presentaven diferències respecte els valors basals. Igualment, no trobem canvis en el comportament dels animals intoxicats ni alteracions morfològiques en els receptors vestibulars perifèrics.



De manera paral·lela, aquest experiment volia determinar si una exposició intermitent al CS<sub>2</sub> provocava uns efectes més accentuats sobre ambdós sistemes que una exposició estable i continua amb una dosi final equivalent. Així doncs, es va comprar la pèrdua auditiva i els canvis del NPR de les rates co-exposades al soroll ric en baixes freqüències + 250 ppm de CS<sub>2</sub> de manera intermitent (1 x 15 min/h) i les rates co-exposades al soroll + 63 ppm de CS<sub>2</sub> de manera contínua, les quals van rebre la mateixa dosi de solvent al llarg de les 6 h d'exposició diàries.

En ambdós grups es van generar pèrdues auditives entre 3,6 i 6 kHz, sense haver-hi, per tant, diferències significatives en cap de les freqüències mesurades, ni en el final de l'exposició ni després del període de recuperació entre ambdós grups. Així doncs, el patró temporal d'exposició no influeix sobre l'efecte del solvent al sistema auditiu, fent que la dosi final administrada sigui el principal factor a tenir en compte.

Pel que fa al sistema vestibular, trobem una lleugera diferència significativa entre els dos grups ja que els animals exposats de manera contínua presenten alguns canvis al final de les 4 setmanes d'exposició, mentre que el grup intermitent roman estable durant tot l'experiment. En aquest cas, el patró temporal d'exposició sí que té un impacte sobre l'efecte del solvent al sistema vestibular.

## 6.4 Efecte del CS<sub>2</sub> sobre el reflex de l'orella mitjana

Depenent de la naturalesa del soroll (impulsiu o continu), diversos efectes traumàtics poden ser induïts en còclea. Els primers resultats d'aquest estudi ens indiquen que els sorolls impulsius són clarament més perjudicials que els sorolls continus quan tots els paràmetres acústics són equivalents (espectre i energia). Aquestes dades confirmen els resultats ja obtinguts en estudis precedents pel nostre laboratori (Campo et al., 2014; Lataye and Campo, 1996; Venet et al., 2015) i, igualment, per altres equips (Henderson and Hamernik, 1986).

Aquests efectes es troben il·lustrats en els anàlisis histològics. Els estereocilis de la tercera fila de CCE es troben clarament danyats després de l'exposició al soroll impulsiu comparat amb els exposats al continu. Es van observar estereocilis trencats i, fins i tot, arrencats en els òrgans de Corti d'animals exposats a sorolls impulsius, tot i que la  $L_{EX,8h}$  era moderada i el període d'exposició era relativament curt. Es demostra, per tant, que més enllà de la intensitat, l'estructura temporal del soroll pot afectar l'eficàcia dels mecanismes de protecció naturals com el ROM. Mentre que l'impacte d'un soroll continu sobre la còclea pot ser atenuat pel ROM, l'impacte de soroll impulsiu no (Dunn et al, 1991; Lataye and Campo, 1996). De fet, l'energia acústica d'aquest darrer tipus de soroll penetra dins la còclea abans que el ROM sigui activat (Borg et al, 1984; Stevin, 1986). Per tant, el ROM apareix com un fenomen clau en termes de prevenció ja que redueix considerablement l'energia acústica absorbida per l'oïda interna (Campo et al., 2014).

Aquesta diferència en els efectes és encara més evident quan l'exposició al soroll es combina amb un solvent. L'exposició a solvents pot modificar la funció del ROM i, per tant, l'impacte de l'exposició combinada del solvent i el soroll pot diferir de l'exposició al soroll sol (Wathier et al., 2016). En aquest projecte, s'ha estudiat els efectes d'un solvent molt lipòfil, el CS<sub>2</sub>, el qual es sap que és neurotòxic. En els experiments realitzats, no es va observar cap efecte cocleotòxic després de l'exposició al CS<sub>2</sub> sol, sense una pèrdua cel·lular evident. També es va comprovar que les CCE funcionaven correctament després d'aquesta exposició ja que les amplituds dels PDA van ser similars als obtinguts abans de l'exposició. Així i tot, encara que en les condicions d'aquest estudi el CS<sub>2</sub> no va mostrar cap efecte cocleotòxic, podria tenir la capacitat de modificar la funció del ROM.

De fet, la comparació dels resultats obtinguts després de la co-exposició al soroll continu i al soroll impulsu, evidencia la capacitat del CS<sub>2</sub> per modificar aquesta funció del reflex, com passa amb altres solvents aromàtics quan es troben associats amb el soroll, com l'estirè (Venet et al., 2015). En aquest estudi es va obtenir un efecte sinèrgic del dany sobre la còclea quan els animals eren co-exposats a CS<sub>2</sub> i soroll impulsu, i, contràriament, es va percebre una tendència a reduir la lesió coclear amb la combinació de CS<sub>2</sub> i soroll continu. Com l'estirè, el CS<sub>2</sub> pot tenir un impacte farmacològic ràpid sobre el SNC, disminuint el llindar d'activació del ROM. Aquest efecte podria ser causat per un canvi en la polarització de la membrana plasmàtica (Magnusson et al., 1998). De fet, s'ha demostrat que el toluè modifica el funcionament dels canals dependents de Ca<sup>2+</sup> que intervenen en el ROM (Maguin et al., 2009). Aquests tipus de modificacions podrien ser la raó per la qual el llindar d'aquest reflex es redueix en presència de solvents aromàtics i pot explicar per què la co-exposició al soroll + solvent altera l'impacte dels sorolls continus sobre l'audició. Tenint en compte la durada de l'exposició i la intensitat del soroll utilitzat en aquest estudi, el CS<sub>2</sub> podria disminuir el llindar d'activació del ROM, i conseqüentment, augmentar l'amplitud d'aquest reflex, reduint l'efecte cocleotraumàtic causat pel soroll continu. Però, contràriament, la co-exposició al CS<sub>2</sub> augmenta de manera clara la vulnerabilitat de l'òrgan de Corti al soroll impulsu. Això suggereix un augment de la toxicitat coclear del soroll en presència de CS<sub>2</sub> que només es manifesta en el cas del soroll impulsu ja que aquest tipus de soroll exclou l'activitat protectora del ROM. Al final del període d'exposició, en els animals co-exposats al soroll impulsu i al CS<sub>2</sub> es van observar estereocilis danyats i, després del període de recuperació, trobem una evident pèrdua cel·lular, a la tercera fila de CCE, entre 8 i 13 kHz, la qual cosa correspon a mitja octava per sobre de la freqüència central de l'espectre del soroll generat. Com demostra Venet et al., 2015, el solvent té la capacitat de potenciar de manera específica el dany sobre les cèl·lules estimulades pel soroll (mitja octava per sobre de la freqüència central de l'espectre del soroll generat). Contràriament, el soroll impulsu sol només va trencar els estereocilis, sense causar pèrdua cel·lular.

Sigui quin sigui el tipus de fenomen sinèrgic, els resultats obtinguts indiquen que una baixa concentració de CS<sub>2</sub> potencia el dany coclear causat pel soroll impulsu, mentre que sembla ser que hi hauria una tendència a reduir el dany causat pel soroll continu, encara que les dades entre el soroll sol i en co-exposició no presentin una diferència estadísticament significativa. Per tant, el CS<sub>2</sub> pot tenir dos impactes diferents, d'una banda potser tingui la capacitat de modificar el SNC alterant el ROM i disminuint el llindar d'activació d'aquest i, de l'altra, potencia la gravetat dels efectes produïts pel soroll impulsu sobre les cèl·lules ciliades.

## 6.5 Valors límits d'exposició professional

Els valors límits d'exposició professional (VLEP) són valors de referència per l'evolució i el control dels riscos inherents a l'exposició al agents químics presents als llocs de treball i, per tant, protegir la salut dels treballadors (INSHT, 2017). El valor límit ambiental (VLA) d'un compost químic és un valor de referència per la concentració d'aquest compost en aire, i representen condicions a les quals es creu, basant-se amb els coneixements actuals, que la majoria de les persones poden estar exposats durant un temps determinat sense risc d'alteració de la salut.

Troblem dos tipus de VLEP. Per una banda, el valor límit d'exposició professional diària (VLEP<sub>8h</sub>) que és el valor de referència per l'exposició diària, els quals representen condicions en les quals la majoria de treballadors poden estar exposats 8 hores diàries i 40 hores setmanals durant tota la seva vida laboral, sense patir efectes adversos per la salut. I, per altra banda, el valor límit d'exposició professional a curt terme (VLEP<sub>CT</sub>) el qual es refereix a la concentració màxima d'un compost químic per un període de 15 min.

Els VLEP s'estableixen per l'exposició a agents químics específics i no per les seves mescles. Ara bé, quan estan presents en l'ambient diversos agents que exerceixen la mateixa acció sobre els mateixos òrgans i sistemes, és un efecte combinat que requereix una consideració preferent.

El VLEP<sub>8h</sub> pel CS<sub>2</sub> definit per la *Occupational Safety and Health Administration (OSHA)* per els Estats Units i la definida per l'*European Agency for Safety and Health at Work*, són baixes, de 20 i 5 ppm, respectivament. No obstant, els VLEP<sub>CT</sub> pel CS<sub>2</sub> són majors, 30 ppm a Estats Units per una exposició de 30 min, mentre que el límit màxim d'Europa és de 25 ppm per 15 min exposició.

És per això que, en terme de prevenció, podem dir que els efectes observats a nivell auditiu són significatius a partir d'una concentració equivalent a 40 vegades la VLEP<sub>8h</sub> (250 ppm sobre 6h = 40 x 5 ppm sobre 8 h), i els efectes observats sobre el sistema vestibular es donen a partir d'una concentració de 10 vegades la VLEP<sub>8h</sub> (63 ppm sobre 6h = 10 x 5 ppm sobre 8 h). Igualment, és suficient una exposició a 250 ppm de CS<sub>2</sub> de 15 min/h per (10 vegades la VLEP<sub>CT</sub>) per obtenir pèrdues auditives diferents que les observades pel soroll sol, i un efecte significatiu sobre el sistema vestibular. És per això, que s'han de qüestionar els nivells d'aquests valors en cas de la co-exposició amb el soroll.

## **6.6 Consideracions finals**

Al llarg d'aquest estudi, s'ha buscat conèixer si el CS<sub>2</sub> és un agent cocleotòxic i si pot ser tòxic pel sistema vestibular. Així mateix, s'ha estudiat l'efecte de la co-exposició amb un soroll ric en baixes freqüències, del qual poc es sap dels seus efectes sobre l'audició i el sistema vestibular.

El soroll ric en baixes freqüències provoca una pèrdua auditiva a una octava per sobre de la freqüència d'estimulació, i es produeix una recuperació parcial de la capacitat auditiva perifèrica 4 setmanes després de l'exposició. Ja que no s'ha trobat cap evidència d'aquesta pèrdua sobre la morfologia de la còclea, podem suposar que el soroll és capaç de provocar un lleuger desacoblament mecànic dels estereocilis amb la membrana tectorial, una modificació de la rigidesa dels estereocilis a nivell de les CCE, o bé una reorganització sinàptica a nivell d'aquestes cèl·lules, afectant així el procés de transducció mecanosensorial.

A partir de 250 ppm, el CS<sub>2</sub> potencia els efectes del soroll de baixa freqüència sobre l'audició augmentant el rang de freqüències afectades, però disminueix la pèrdua auditiva dins la gamma de freqüències ja alterades pel soroll. Aquest darrer efecte és major quan les exposicions al CS<sub>2</sub> són intermitents. El fenomen és temporal i no sembla generar dèficits auditius complementaris permanents.

Ja que no es troba cap canvi morfològic a nivell de la còclea, la qual cosa significa que els dèficits funcionals registrats no es poden explicar per una lesió important i visible sobre l'òrgan de Corti o les neurones ganglionars, hipotetitzem que el CS<sub>2</sub> té dos impactes diferents a nivell central. Per una banda eixampla el rang de freqüències afectades, fenomen que es podria explicar per una influència sobre les vies eferents que controlen les cèl·lules ciliades o per una acció sobre la mecànica coclear. I, per una altra banda, disminueix l'amplitud de les pèrdues causades pel soroll, probablement per una acció neuroactiva que provoca una disminució del llindar d'activació del ROM. Aquesta acció va ser confirmada després de comprovar que la pèrdua auditiva d'una co-exposició a un soroll continu és menor que quan l'exposició és al soroll continu sol, mentre que la co-exposició amb un soroll impulsiu augmenta la pèrdua auditiva provocada pel soroll impulsiu sol.

Igualment, el CS<sub>2</sub> afecta l'equilibri disminuint el nombre, la durada, i la pendent d'amortiment de les sacades del NPR. Així doncs, a partir d'una exposició de 15 min cada 30 min a 250 ppm, el solvent és capaç de pertorbar la funció vestibular, però no és suficient per provocar alteracions del comportament en els animals intoxicats, la qual cosa ens fa pensar que hi ha un increment del llindar del nistagme en animals co-exposats en comparació amb els controls. Aquest fenomen és temporal menys a 500 ppm, que 4 setmanes després de l'exposició seguim trobant canvis significatius. Així doncs, podem suposar 500 ppm de CS<sub>2</sub> (6h/dia durant 4 setmanes) pot ser capaç de crear una axonopatia neurofilamentosa distal, provocant així la disminució en la velocitat de conducció dels nervis. Aquest efecte axonopàtic del CS<sub>2</sub> ja ha estat demostrat en la literatura per altres dosis i temps d'exposicions. A més, podem parlar d'un efecte de co-exposició ja que el CS<sub>2</sub> sol té uns efectes menors que la co-exposició amb el soroll. El soroll pot pertorbar els paràmetres del NPR modificant el flux de l'endolimfa que es troba dins els canals semi-circulars. Aquest fet pot unir-se a l'efecte del CS<sub>2</sub>.

Les dades d'aquest estudi no ens permeten conèixer de manera precisa el lloc d'origen de les pertorbacions observades a nivell del sistema vestibular, no obstant, l'absència de canvis en la morfologia dels receptors perifèrics, del comportament dels animals i de l'expressió gènica de molts marcadors de neurotoxicitat al cervell suggereixen una modificació neuroquímica transitòria de les vies centrals que controlen el RVO. Podem pensar que el tòxic danya la funció central del RVO a causa de l'augment de l'activitat dels neurotransmissors inhibitoris i la interrupció dels sistemes colinèrgic i noradrenèrgic de la neurotransmissió.



## **7 . CONCLUSIONS**





1. El soroll ric en baixes freqüències provoca una pèrdua auditiva a una octava per sobre de la freqüència d'estimulació. Aquesta pèrdua és parcialment reversible, i no s'explica per cap alteració morfològica evident a diversos nivells d'anàlisi emprats per l'estudi de la còclea.
2. En les nostres condicions experimentals, el CS<sub>2</sub> no és un agent ototòxic. La seva administració sola no comporta alteracions evidents en el sistema perifèric auditiu ni vestibular.
3. A causa d'una probable acció sobre el SNC, el CS<sub>2</sub> té la capacitat d'alterar els sistemes auditiu i vestibular.
4. El CS<sub>2</sub> pot agreujar de manera depenent de dosi els efectes transitoris del soroll sobre el sistema auditiu estenent les pèrdues auditives cap a les altes freqüències, i és capaç d'accentuar l'alteració sobre el sistema vestibular augmentant els canvis en els paràmetres estudiats del NPR.
5. La co-exposició al soroll i al CS<sub>2</sub> és capaç d'alterar la funcionalitat del sistema auditiu i vestibular, però sense alterar de manera evident el comportament motor dels animals ni la morfologia de l'orella interna.
6. El CS<sub>2</sub> pertorba el sistema auditiu i el sistema vestibular a dosis diferents. Al sistema auditiu els canvis comencen a ser significatius a partir de la dosi de 250 ppm, mentre que al sistema vestibular comença a haver-hi algunes modificacions a partir de 63 ppm. Aquesta diferència pot deure's a que el CS<sub>2</sub> afecte al vestíbul a concentracions més baixes que l'audició o, simplement, que la sensibilitat de les mesures funcionals que s'utilitzen per analitzar cada un dels sistemes és diferent.
7. El patró temporal d'exposició no influeix sobre l'efecte del solvent al sistema auditiu, fent que la dosi final administrada sigui el principal factor a tenir en compte. Pel que fa al sistema vestibular, el patró d'exposició sí modifica l'efecte final del CS<sub>2</sub>.

8. Una concentració de 500 ppm de CS<sub>2</sub> provoca una disfunció permanent sobre el sistema vestibular però no sobre el sistema auditiu. A dosis menors, el solvent no modifica la reversibilitat dels efectes en cap dels dos sistemes.
9. El model establert en aquest projecte permetrà obtenir, en estudis futurs, molta més informació sobre l'ototoxicitat de diferents compostos en co-exposició amb el soroll, estudiant la toxicitat a través de mesures funcionals del sistema auditiu (PDA) i del sistema vestibular (NPR), així com a través de diferents tests de comportament i l'estudi de la morfologia de l'orella interna.

## **8 . BIBLIOGRAFIA**



## A

- Agrawal, Y., Carey, J.P., Della Santina, C.C., Schubert, M.C., Minor, L.B., 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2004. *Arch. Intern. Med.* 169, 938–944. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.66>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Arai, Y., Suzuki, J., 1996. Adaptation of primate vestibuloocular reflex to altered peripheral vestibular inputs. I. Frequency-specific recovery of horizontal VOR after inactivation of the lateral semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 76, 2941–2953. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.5.2941>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Suzuki, J., 1995. Differential processing of semicircular canal signals in the vestibulo-ocular reflex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7201–7216.
- Araki, S., Murata, K., Yokoyama, K., Uchida, E., 1992. Auditory event-related potential (P300) in relation to peripheral nerve conduction in workers exposed to lead, zinc, and copper: effects of lead on cognitive function and central nervous system. *Am. J. Ind. Med.* 21, 539–547.
- Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A., Aurousseau, C., 1982. The comparative ototoxicities of gentamicin, tobramycin and dibekacin in the guinea pig. A functional and morphological cochlear and vestibular study. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 390, 1–30.
- Ashmore, J., Avan, P., Brownell, W.E., Dallos, P., Dierkes, K., Fettiplace, R., Grosh, K., Hackney, C.M., Hudspeth, A.J., Jülicher, F., Lindner, B., Martin, P., Meaud, J., Petit, C., Santos Sacchi, J.R., Canlon, B., 2010. The remarkable cochlear amplifier. *Hear. Res., Special Issue: Annual Reviews 2010* 266, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.05.001>
- Avan, P., Bonfils, P., Mom, T., 2001. Correlations among Distortion Product Otoacoustic Emissions, Thresholds and Sensory Cell Impairments. *Noise Health* 3, 1–18.

## B

- Babisch, W., 2003. Stress hormones in the research on cardiovascular effects of noise. *Noise Health* 5, 1–11.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2001. Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res.* 904, 298–306.
- Balbuena, E., Llorens, J., 2003. Comparison of cis- and trans-crotononitrile effects in the rat reveals specificity in the neurotoxic properties of nitrile isomers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187, 89–100.
- Baumann, O., Borra, R.J., Bower, J.M., Cullen, K.E., Habas, C., Ivry, R.B., Leggio, M., Mattingley, J.B., Molinari, M., Moulton, E.A., Paulin, M.G., Pavlova, M.A., Schmähmann, J.D., Sokolov, A.A., 2015. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 197–220. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0627-7>
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2007. *Neuroscience: Exploring the brain* (3a. ed). Lippicott Williams and Wilkins.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Goldberg, L., 1983. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 11, 169–278. <https://doi.org/10.3109/10408448309128255>
- Beaudoin, N., Weiss-Lambrou, R., 1984. Le nystagmus: une revue des principes et des méthodes d'évaluation. *Can. J. Occup. Ther.* 51, 25–29. <https://doi.org/10.1177/000841748405100105>

- Billig, I., Yeager, M.S., Blikas, A., Raz, Y., 2007. Neurons in the cochlear nuclei controlling the tensor tympani muscle in the rat: a study using pseudorabies virus. *Brain Res.* 1154, 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.007>
- Black, F.O., Gianna-Poulin, C., Pesznecker, S.C., 2001. Recovery from vestibular ototoxicity. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 22, 662–671.
- Black, F.O., Pesznecker, S., Stallings, V., 2004. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 25, 559–569.
- Blanks, R.H., Precht, W., 1978. Response properties of vestibular afferents in alert cats during optokinetic and vestibular stimulation. *Neurosci. Lett.* 10, 225–229.
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., Llorens, J., 2005. Behavioral and Pathological Effects in the Rat Define Two Groups of Neurotoxic Nitriles. *Toxicol. Sci.* 88, 456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314>
- Boadas-Vaello, P., Sedó-Cabezón, L., Verdú, E., Llorens, J., 2017. Strain and Sex Differences in the Vestibular and Systemic Toxicity of 3,3'-Iminodipropionitrile in Mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 156, 109–122. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw238>
- Bohne, B.A., Harding, G.W., 2000. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am. J. Otol.* 21, 505–509.
- Bonfils, P., Remond, M.C., Pujol, R., 1986. Efferent tracts and cochlear frequency selectivity. *Hear. Res.* 24, 277–283.
- Bonsacquet, J., Brugeaud, A., Compan, V., Desmadryl, G., Chabbert, C., 2006. AMPA type glutamate receptor mediates neurotransmission at turtle vestibular calyx synapse. *J. Physiol.* 576, 63–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.116467>
- Borg, E., 1973. On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. A physiological and anatomical study. *Brain Res.* 49, 101–123.
- Borg, E., Counter, S., Röster, G., 1984. Theories of middle-ear muscle functions. Silman Shlomo Ed. *Acoust. Reflex Basic Princ. Clin. Appl.* 77–9.
- Brandenberger, G., Follenius, M., Wittersheim, G., Salame, P., 1980. Plasma catecholamines and pituitary adrenal hormones related to mental task demand under quiet and noise conditions. *Biol. Psychol.* 10, 239–252.
- Brieger, H., 1967. Carbon disulphide in the living organism. Retention, biotransformation and pathophysiological effects. H Brieger J Teisin. Eds *Toxicol. Carbon Disulfide - proceedings Excerpta Medica Found. Amst.* 27–31.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., de Ribaupierre, Y., 1985. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227, 194–196.
- Burdick, C., 1982. Hearing Loss from Low-frequency Noise.
- Burdick, C.K., Patterson, J.H., Mozo, B.T., Camp, R.T., 1978. Threshold shifts in chinchillas exposed to octave bands of noise centered at 63 and 1000 Hz for three days(a). *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 458–466.
- Bus, J.S., 1985. The relationship of carbon disulfide metabolism to development of toxicity. *Neurotoxicology* 6, 73–80.

## C

- Campbell, L., Jones, A.H., Wilson, H.K., 1985. Evaluation of occupational exposure to carbon disulphide by blood, exhaled air, and urine analysis. *Am. J. Ind. Med.* 8, 143–53. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700080209>
- Campo, P., 2015. Les ototoxiques exacerbent les surdités induites par le bruit.pdf. *Env. Risque Sante* 14, 125–134.
- Campo, P., Lataye, R., Cossec, B., Placidi, V., 1997. Toluene-induced hearing loss: a mid-frequency location of the cochlear lesions. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 129–140.
- Campo, P., Lataye, R., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Styrene-induced hearing loss: a membrane insult. *Hear. Res.* 154, 170–180.
- Campo, P., Loquet, G., Blachère, V., Roure, M., 1999. Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 427–434.
- Campo, P., Maguin, K., Lataye, R., 2007. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 99, 582–590. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm180>
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis.-Mon. DM* 59, 119–138. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003>
- Campo, P., Venet, T., Rumeau, C., Thomas, A., Rieger, B., Cour, C., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., 2011. Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hear. Res.* 280, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.04.016>
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene. Consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.009>
- Cardinali, D.P., 2007. Neurociencia aplicada: sus fundamentos. Ed. Médica Panamericana.
- Carlisle, L., Zajic, G., Altschuler, R.A., Schacht, J., Thorne, P.R., 1988. Species differences in the distribution of infracuticular F-actin in outer hair cells of the cochlea. *Hear. Res.* 33, 201–205.
- Cassandro, E., Chiarella, G., Catalano, M., Gallo, L.V., Marcelli, V., Nicastrì, M., Petrolo, C., 2003. Changes in clinical and instrumental vestibular parameters following acute exposition to auditory stress. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Otorinolaringol. E Chir. Cerv.-facc.* 23, 251–256.
- Cavalleri, A., Maugeri, U., Visconti, E., 1970. Urinary excretion of testosterone and gonadotropins stimulating interstitial cells (ICSH) in persons exposed to carbon disulfide. *Arch. Mal. Prof.* 31, 23–30.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., 1982. Frequency sensitivity and selectivity of acoustically evoked potentials after complete cochlear hair cell destruction. *Brain Res.* 231, 197–203.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A., Auroousseau, C., 1983. Vestibular acoustic reception in the guinea pig: a saccular function? *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 95, 211–217.
- Chang, S.J., Chen, C.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Sung, F.C., 2007. Risk for hypertension in workers exposed to carbon disulfide in the viscose rayon industry. *Am. J. Ind. Med.* 50, 22–27. <https://doi.org/10.1002/ajim.20409>
- Chang, S.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Chen, C.J., Chang, H.Y., Sung, F.C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- Chen, G.D., Chi, L.H., Kostyniak, P.J., Henderson, D., 2007. Styrene induced alterations in biomarkers of exposure and effects in the cochlea: mechanisms of hearing loss. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 98, 167–177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm078>



- Chen, G.D., Fechter, L.D., 1999. Potentiation of octave-band noise induced auditory impairment by carbon monoxide. *Hear. Res.* 132, 149–159.
- Chen, G.-D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.04.005>
- Cheng, A.G., Cunningham, L.L., Rubel, E.W., 2005. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 13, 343–348.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532–534, 536–537.
- Chu, C.C., Huang, C.C., Chu, N.S., Wu, T.N., 1996. Carbon disulfide induced polyneuropathy: sural nerve pathology, electrophysiology, and clinical correlation. *Acta Neurol. Scand.* 94, 258–263.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90069-9)
- Cody, A.R., Russell, I.J., 1985. Outer hair cells in the mammalian cochlea and noise-induced hearing loss. *Nature* 315, 662–665.
- Cohen, B., 1984. Examination of the vestibular system and of the vestibular-ocular reflex. Oosterveld WJ Ed *Otoneurology* John Wiley Sons Chichester 87–109.
- Cohen, S., Krantz, D.S., Evans, G.W., Stokols, D., 1981. Cardiovascular and behavioral effects of community noise. *Am. Sci.* 69, 528–535.
- Collins, P.W., 1988. Synergistic interactions of gentamicin and pure tones causing cochlear hair cell loss in pigmented guinea pigs. *Hear. Res.* 36, 249–259.
- Colombi, A., Maroni, M., Picchi, O., Rota, E., Castano, P., Ag, V.F., 1981. Carbon Disulfide Neuropathy in Rats. A Morphological and Ultrastructural Study of Degeneration and Regeneration. *Clin. Toxicol.* 18, 1463–1474. <https://doi.org/10.3109/15563658108990355>
- Corwin, J.T., Jones, J.E., Katayama, A., Kelley, M.W., Warchol, M.E., 1991. Hair cell regeneration: the identities of progenitor cells, potential triggers and instructive cues. *Ciba Found. Symp.* 160, 103–120; discussion 120–130.
- Cotanche, D.A., 1987. Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear. Res.* 30, 181–195.
- Courjon, J.H., Jeannerod, M., Ossuzio, I., Schmid, R., 1977. The role of vision in compensation of vestibulo ocular reflex after hemilabyrinthectomy in the cat. *Exp. Brain Res.* 28, 235–248.
- Crane, B.T., Viirre, E.S., Demer, J.L., 1997. The human horizontal vestibulo-ocular reflex during combined linear and angular acceleration. *Exp. Brain Res.* 114, 304–320.
- Cransac, H., Cottet-Emard, J.M., Hellström, S., Peyrin, L., 1998. Specific sound-induced noradrenergic and serotonergic activation in central auditory structures. *Hear. Res.* 118, 151–156.
- Crofton, K.M., Janssen, R., Prazma, J., Pulver, S., Barone, S., 1994. The ototoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile: functional and morphological evidence of cochlear damage. *Hear. Res.* 80, 129–140.
- Cunningham, L.L., 2006. The adult mouse utricle as an in vitro preparation for studies of ototoxic-drug-induced sensory hair cell death. *Brain Res.* 1091, 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.128>
- Cunningham, L.L., Cheng, A.G., Rubel, E.W., 2002. Caspase Activation in Hair Cells of the Mouse Utricle Exposed to Neomycin. *J. Neurosci.* 22, 8532–8540.

## D

- Dalet, A., Bonsacquet, J., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chidavaenzi, R.L., Venteo, S., Desmadryl, G., Goldberg, J.M., Lysakowski, A., Chabbert, C., 2012. Glutamate transporters EAAT4 and EAAT5 are expressed in vestibular hair cells and calyx endings. *PloS One* 7, e46261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046261>
- Dancer, A., 1988. Biomécanique de l'audition. *Physiologie de la Cochlée*. INSERM Paris 27–73.
- Danielsson, A., Landström, U., 1985. Blood pressure changes in man during infrasonic exposure. An experimental study. *Acta Med. Scand.* 217, 531–535.
- Dannhof, B.J., Bruns, V., 1993. The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66, 8–22. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90255-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90255-Y)
- Darlington, C.L., Dutia, M.B., Smith, P.F., 2002. The contribution of the intrinsic excitability of vestibular nucleus neurons to recovery from vestibular damage. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1719–1727.
- Davis, H., 1983. An active process in cochlear mechanics. *Hear. Res.* 9, 79–90.
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol.* CB 15, R583–586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- De Fruyt, F., Thiery, E., De Bacquer, D., Vanhoorne, M., 1998. Neuropsychological effects of occupational exposures to carbon disulfide and hydrogen sulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 4, 139–146. <https://doi.org/10.1179/oeh.1998.4.3.139>
- Dechesne, C., Mbiene, J.P., Sans, A., 1986. Postnatal development of vestibular receptor surfaces in the rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 101, 11–18.
- DeCory, L., Dancer, A., Aran, J., 1992. Species differences and mechanisms of damage. Eds Noise-Induc. *Hear. Loss St Louis MO Mosby Year* 73–88.
- DeJoy, D.M., 1984. The nonauditory effects of noise: review and perspectives for research. *J. Aud. Res.* 24, 123–150.
- Deol, M.S., Gluecksohn-Waelsch, S., 1979. The role of inner hair cells in hearing. *Nature* 278, 250–252.
- Desmadryl, G., Gaboyard-Niay, S., Brugeaud, A., Travo, C., Broussy, A., Saleur, A., Dyhrfeld-Johnsen, J., Wersinger, E., Chabbert, C., 2012. Histamine H4 receptor antagonists as potent modulators of mammalian vestibular primary neuron excitability. *Br. J. Pharmacol.* 167, 905–916. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02049.x>
- Dieroff, H.G., 1976. Possibilities of improving the diagnosis of noise-induced hearing damage by means of directional audiometry, the dichotic speech discrimination test, and the EEG1. *Audiol. Off. Organ Int. Soc. Audiol.* 15, 152–162.
- Dietzmann, K., Laass, W., 1977. Histological and histochemical studies on the rat brain under conditions of carbon disulfide intoxication. *Exp. Pathol. (Jena)* 13, 320–327.
- Ding, D., McFadden, S.L., Woo, J.M., Salvi, R.J., 2002. Ethacrynic acid rapidly and selectively abolishes blood flow in vessels supplying the lateral wall of the cochlea. *Hear. Res.* 173, 1–9.
- DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union*.
- Discalzi, G., Fabbro, D., Meliga, F., Mocellini, A., Capellaro, F., 1993. Effects of occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 14, 21–25.
- Drexler, H., Göen, T., Angerer, J., 1995. Carbon disulphide. II. Investigations on the uptake of CS<sub>2</sub> and the excretion of its metabolite 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid after occupational exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 5–10.

- Dunn, D.E., Davis, R.R., Merry, C.J., Franks, J.R., 1991. Hearing loss in the chinchilla from impact and continuous noise exposure. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 1979–1985.
- Dupont, J., Guilhaume, A., Aran, J.M., 1993. Neuronal degeneration of primary cochlear and vestibular innervations after local injection of sisomicin in the guinea pig. *Hear. Res.* 68, 217–228.
- Dvorkin, M.A., Cardinali, D.P., 2010. Best & Taylor. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*, 14th ed. Ed. Médica Panamericana.

## E

- Eatock, R.A., Xue, J., Kalluri, R., 2008. Ion channels in mammalian vestibular afferents may set regularity of firing. *J. Exp. Biol.* 211, 1764–1774. <https://doi.org/10.1242/jeb.017350>
- Ernfors, P., Duan, M.L., ElShamy, W.M., Canlon, B., 1996. Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nat. Med.* 2, 463–467.

## F

- Fay, R.R., 1988. Comparative psychoacoustics. *Hear. Res.* 34, 295–305.
- Fechter, L.D., Carlisle, L., 1990. Auditory dysfunction and cochlear vascular injury following trimethyltin exposure in the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105, 133–143.
- Fechter, L.D., Cheng, G.-D., Rao, D., 2000. Characterising conditions that favour potentiation of noise induced hearing loss by chemical asphyxiants. *Noise Health* 3, 11–21.
- Fechter, L.D., Gearhart, C., Shirwany, N.A., 2004. Acrylonitrile potentiates noise-induced hearing loss in rat. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 90–98. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4028-8>
- Fee, W.E., 1980. Aminoglycoside ototoxicity in the human. *The Laryngoscope* 90, 1–19.
- Felten, D.L., Shetty, A.N., 2010. Netter, atlas de neurociencia (2a ed.). Elsevier España.
- Fetoni, A.R., Ferraresi, A., Picciotti, P., Gaetani, E., Paludetti, G., Troiani, D., 2009. Noise induced hearing loss and vestibular dysfunction in the guinea pig. *Int. J. Audiol.* 48, 804–810. <https://doi.org/10.3109/14992020903023140>
- Fettiplace, R., 2017. Hair cell transduction, tuning and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr. Physiol.* 7, 1197–1227. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160049>
- Fleig, A., Penner, R., 2004. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.004>
- Flock, A., 1977. Physiological properties of sensory hairs in the ear, in: *Psychophysics and Physiology of Hearing*. E.F. Evans and J.P. Wilson. Academic Press, London, pp. 15–25.
- Flock, A., Flock, B., 2000. Hydrops in the cochlea can be induced by sound as well as by static pressure. *Hear. Res.* 150, 175–188.
- Flock, A., Flock, B., Fridberger, A., Scarfone, E., Ulfendahl, M., 1999. Supporting cells contribute to control of hearing sensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4498–4507.
- Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kelsell, R.E., McNulty, S., 2006. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 159–178. <https://doi.org/10.1080/10799890600637506>

- Forge, A., 1982. A tubulo-cisternal endoplasmic reticulum system in the potassium transporting marginal cells of the stria vascularis and effects of the ototoxic diuretic ethacrynic acid. *Cell Tissue Res.* 226, 375–387.
- Forge, A., 1985. Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear. Res.* 19, 171–182.
- Forge, A., Brown, A.M., 1982. Ultrastructural and electrophysiological studies of acute ototoxic effects of furosemide. *Br. J. Audiol.* 16, 109–116.
- Forge, A., Li, L., 2000. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear. Res.* 139, 97–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00177-X)
- Forge, A., Schacht, J., 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurotol.* 5, 3–22. <https://doi.org/10.1159/000013861>
- Frantík, E., 1970. The development of motor disturbances in experimental chronic carbon disulphide intoxication. *Med. Lav.* 61, 309–313.
- Frolenkov, G.I., Atzori, M., Kalinec, F., Mammano, F., Kachar, B., 1998. The membrane-based mechanism of cell motility in cochlear outer hair cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 1961–1968.
- Froymovich, O., Rebala, V., Salvi, R.J., Rassael, H., 1995. Long-term effect of acoustic trauma on distortion product otoacoustic emissions in chickens. *J. Acoust. Soc. Am.* 97, 3021–3029.

## G

- Gabersek, V., Aboulker, P., Pialoux, P., Laurent, J., 1963. Methods of recording nystagmus. Major significance of the potentiometric method. *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Soc. Oto-Laryngol. Hopitaux Paris* 80, 619–661.
- Gacek, R.R., 1982. Afferent and efferent innervation of the labyrinth. *Adv. Otorhinolaryngol.* 28, 1–13.
- Goddé-Jolly, D., Larmande, A., 1973. Nystagmus. *Bull. Mem. Soc. Fr. Ophtalmol.* 86, 1–14.
- Goldberg, J.M., Fernández, C., 1980. Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. *J. Neurophysiol.* 43, 986–1025. <https://doi.org/10.1152/jn.1980.43.4.986>
- Goodyear, R.J., Gale, J.E., Ranatunga, K.M., Kros, C.J., Richardson, G.P., 2008. Aminoglycoside-induced phosphatidylserine externalization in sensory hair cells is regionally restricted, rapid, and reversible. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9939–9952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1124-08.2008>
- Gottfried, M.R., Graham, D.G., Morgan, M., Casey, H.W., Bus, J.S., 1985. The morphology of carbon disulfide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 6, 89–96.
- Graham, D.G., Amarnath, V., Valentine, W.M., Pyle, S.J., Anthony, D.C., 1995. Pathogenetic Studies of Hexane and Carbon Disulfide Neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 91–112. <https://doi.org/10.3109/10408449509021609>
- Guinan, J.J., Salt, A., Cheatham, M.A., 2012. Progress in cochlear physiology after Békésy. *Hear. Res.* 293, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.05.005>

## H

- Habermann, J., 1890. Über die Schwerhörigkeit der Kesselschmiede. *Arch Ohrenheilk* 30, 1–25.
- Hackney, C.M., Furness, D.N., 1995. Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Am. J. Physiol.* 268, C1–13. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.1.C1>
- Haines, D.E., 2013. *Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*. Elsevier España.
- Halmagyi, G. m., Curthoys, I.S., Colebatch, J.G., Aw, S.T., 2005. Vestibular Responses to Sound. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1039, 54–67. <https://doi.org/10.1196/annals.1325.006>
- Hamers, F.P.T., Wijnenga, J., Wolters, F.L.C., Klis, S.F.L., Sluyter, S., Smoorenburg, G.F., 2003. Cisplatin ototoxicity involves organ of Corti, stria vascularis and spiral ganglion: modulation by alphaMSH and ORG 2766. *Audiol. Neurotol.* 8, 305–315. <https://doi.org/10.1159/000073515>
- Hänninen, H., 1971. Psychological picture of manifest and latent carbon disulphide poisoning. *Br. J. Ind. Med.* 28, 374–381.
- Hänninen, H., Nurminen, M., Tolonen, M., Martelin, T., 1978. Psychological tests as indicators of excessive exposure to carbon disulfide. *Scand. J. Psychol.* 19, 163–174.
- Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C., Hu, B.H., 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 27, 1–19. <https://doi.org/10.1097/01.aud.0000191942.36672.f3>
- Henderson, D., Hamernik, R.P., 1986. Impulse noise: critical review. *J. Acoust. Soc. Am.* 80, 569–584.
- Henkin, R.I., Knigge, K.M., 1963. Effect of sound on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am. J. Physiol.* 204, 701–704.
- Highstein, S.M., Porrill, J., Dean, P., 2005. Report on a workshop concerning the cerebellum and motor learning, held in St Louis October 2004. *Cerebellum Lond. Engl.* 4, 140–150. <https://doi.org/10.1080/14734220510007987>
- Hilding, D., Wersall, J., 1962. Cholinesterase and its relation to the nerve endings in the inner ear. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 55, 205–217.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Goto, S., 1996. A cross-sectional study on nerve conduction velocities among workers exposed to carbon disulphide. *Med. Lav.* 87, 29–34.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992a. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338. <https://doi.org/10.1007/BF01973628>
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992b. A cross-sectional study on the brainstem auditory evoked potential among workers exposed to carbon disulfide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 321–324.
- Hirose, K., Westrum, L.E., Cunningham, D.E., Rubel, E.W., 2004. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J. Comp. Neurol.* 470, 164–180. <https://doi.org/10.1002/cne.11046>
- Hirsh, I.J., Ward, W.D., 1952. Recovery of the Auditory Threshold after Strong Acoustic Stimulation. *J. Acoust. Soc. Am.* 24, 131–141. <https://doi.org/10.1121/1.1906867>
- Hitier, M., Besnard, S., Smith, P.F., 2014. Vestibular pathways involved in cognition. *Front. Integr. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00059>
- Hoar, S.K., Santodonato, J., Cameron, T.P., Kelsey, M.I., 1985. Monographs on human exposures to chemicals in the workplace. *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.* 27, 585–586.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: A review. *Noise Health* 8, 114. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.33952>

- Hoeffding, V., Fechter, L.D., 1991. Trimethyltin disrupts auditory function and cochlear morphology in pigmented rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 135–145.
- Hoet, P., Lison, D., 2008. Ototoxicity of toluene and styrene: state of current knowledge. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 127–170. <https://doi.org/10.1080/10408440701845443>
- Hoffmann, P., Klapperstück, M., 1990. Effects of carbon disulfide on cardiovascular function after acute and subacute exposure of rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 121–128.
- Hoffmann, P., Müller, S., 1990. Subacute carbon disulfide exposure modifies adrenergic cardiovascular actions in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 115–120.
- Hordichok, A.J., Steyger, P.S., 2007. Closure of supporting cell scar formations requires dynamic actin mechanisms. *Hear. Res.* 232, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.06.011>
- Huang, T., Cheng, A.G., Stupak, H., Liu, W., Kim, A., Staecker, H., Lefebvre, P.P., Malgrange, B., Kopke, R., Moonen, G., Van De Water, T.R., 2000. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 18, 259–270.
- Hudak, W.J., Buckeley, J.P., 1961. Production of hypertensive rats by experimental stress. *J. Pharm. Sci.* 50, 263–264.
- Humes, L.E., 1984. Noise-induced hearing loss as influenced by other agents and by some physical characteristics of the individual. *J. Acoust. Soc. Am.* 76, 1318–1329.
- Hunt, M.A., Miller, S.W., Nielson, H.C., Horn, K.M., 1987. Intratympanic injection of sodium arsenite (atoxyl) solution results in postural changes consistent with changes described for labyrinthectomized rats. *Behav. Neurosci.* 101, 427–428.
- Hunter-Duvar, I.M., 1983. An electron microscopic study of the vestibular sensory epithelium. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 95, 494–507.
- Husbands, J.M., Steinberg, S.A., Kurian, R., Saunders, J.C., 1999. Tip-link integrity on chick tall hair cell stereocilia following intense sound exposure. *Hear. Res.* 135, 135–145.

## I

- Iaroslavskii, V.K., 1969. Toxic effect of carbon disulfide on the function of reproduction and increase in the effect produced by tryptophan. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 68, 88–91.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Núñez, G., 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17, 2526–2533. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526>
- INSHT, 2017. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. Inst. Nac. Empl. Segur. Soc. Gob. Esp.
- Ira, F., Stuart, 2014. *Fisiología humana* (13a. ed.). McGraw Hill Mexico.
- Ishiyama, G., 2009. Imbalance and vertigo: the aging human vestibular periphery. *Semin. Neurol.* 29, 491–499. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241039>
- Ising, H., Babisch, W., Kruppa, B., 1999. Noise-Induced Endocrine Effects and Cardiovascular Risk. *Noise Health* 1, 37–48.
- ISO 9612:2009, 2009. URL <https://www.iso.org/standard/41718.html> (accessed 12.18.17).
- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E., Reale, E., 1972. Efferent vestibular fibers in mammals: morphological and histochemical aspects. *Prog. Brain Res.* 37, 429–443.



## J

- Jang, Y., Lee, Y., Kim, S.M., Yang, Y.D., Jung, J., Oh, U., 2012. Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1823–1830. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-1016-8>
- Jensen, D.W., 1983. Survival of function in the deafferented vestibular nerve. *Brain Res.* 273, 175–178.
- Johnson, A.C., 1993. The ototoxic effect of toluene and the influence of noise, acetyl salicylic acid, or genotype. A study in rats and mice. *Scand. Audiol. Suppl.* 39, 1–40.
- Johnson, A.C., Juntunen, L., Nylén, P., Borg, E., Höglund, G., 1988. Effect of interaction between noise and toluene on auditory function in the rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 105, 56–63.
- Johnson, B.L., Boyd, J., Burg, J.R., Lee, S.T., Xintaras, C., Albright, B.E., 1983. Effects on the peripheral nervous system of workers' exposure to carbon disulfide. *Neurotoxicology* 4, 53–65.
- Jones, G.P., Lukashkina, V.A., Russell, I.J., Lukashkin, A.N., 2010. The Vestibular System Mediates Sensation of Low-Frequency Sounds in Mice. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 11, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10162-010-0230-7>
- Jones, S.M., Jones, T.A., Mills, K.N., Gaines, G.C., 2009. Anatomical and Physiological Considerations in Vestibular Dysfunction and Compensation. *Semin. Hear.* 30, 231–241. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241124>

## K

- Kachar, B., Brownell, W.E., Altschuler, R., Fex, J., 1986. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322, 365–368. <https://doi.org/10.1038/322365a0>
- Kaltenbach, J.A., Afman, C.E., 2000. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear. Res.* 140, 165–172.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana.
- Keil, D.E., Padgett, E.L., Barnes, D.B., Pruett, S.B., 1996. Role of decomposition products in sodium methylthiocarbamate-induced immunotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 479–492. <https://doi.org/10.1080/009841096161627>
- Kelly, J.B., Masterton, B., 1977. Auditory sensitivity of the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 930–936.
- Kemp, D.T., 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 1386–1391.
- Khan, S., Chang, R., 2013. Anatomy of the vestibular system: A review. *NeuroRehabilitation* 32, 437–443. <https://doi.org/10.3233/NRE-130866>
- Kiang, N.Y., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C., Ryugo, D.K., 1982. Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science* 217, 175–177.
- Kivistö, H., Elovaara, E., Riihimäki, V., Aitio, A., 1995. Effect of cytochrome P450 isozyme induction and glutathione depletion on the metabolism of CS<sub>2</sub> to TTCA in rats. *Arch. Toxicol.* 69, 185–190. <https://doi.org/10.1007/s002040050156>
- Klaassen, C., Watkins, J.B., 2001. *Manual de Toxicología* (5a. ed.). McGraw-Hill Interamericana.

- Klapperstück, M., Müller, S., Hoffmann, P., 1991. Carbon disulfide exposure attenuates adrenergic inotropic response in rats. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 35, 113–120.
- Knobloch, K., Stetkiewicz, J., Wrońska-Nofer, T., 1979. Conduction velocity in the peripheral nerves of rats with chronic carbon disulphide neuropathy. *Br. J. Ind. Med.* 36, 148–152.
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., Bao, J., 2017. Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.008>
- Komiya, H., Eggermont, J.J., 2000. Spontaneous firing activity of cortical neurons in adult cats with reorganized tonotopic map following pure-tone trauma. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 120, 750–756.
- Kotecha, B., Richardson, G.P., 1994. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear. Res.* 73, 173–184.
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular Effects in Viscose Rayon Workers Exposed to Carbon Disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. <https://doi.org/10.1179/107735201800339713>
- Kowalska, S., Sułkowski, W., Sińczuk-Walczyk, H., 2000. Assessment of the hearing system in workers chronically exposed to carbon disulfide and noise. *Med. Pr.* 51, 123–138.
- Kraft, R., Harteneck, C., 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* 451, 204–211. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>
- Kurabi, A., Keithley, E.M., Housley, G.D., Ryan, A.F., Wong, A.C.-Y., 2017. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* 349, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.013>

## L

- Lacerda, A., Leroux, T., Morata, T., 2005. Ototoxic effects of carbon monoxide exposure: a review. *-Fono Rev. Atualizacao Cient.* 17, 403–412.
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1982. Behavior and characterization of blood carbon disulfide in rats after inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64, 327–34. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90227-7](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90227-7)
- Lam, C.-W., DiStefano, V., 1983. Blood-bound carbon disulfide: An indicator of carbon disulfide exposure, and its accumulation in repeatedly exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70, 402–410. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(83)90158-8)
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1986. Characterization of carbon disulfide binding in blood and to other biological substances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 235–42. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90054-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90054-2)
- Landström, U., 1983. Occupational aspects of infrasound and whole body vibrations. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 34, 287–293.
- Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Odkvist, L.M., 1986. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats. A computerized nystagmographic study. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 101, 422–428.
- Lataye, R., Campo, P., 1996. Applicability of the L(eq) as a damage-risk criterion: an animal experiment. *J. Acoust. Soc. Am.* 99, 1621–1632.
- Lataye, R., Campo, P., 1997. Combined effects of a simultaneous exposure to noise and toluene on hearing function. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 373–382.



- Lataye, R., Campo, P., Barthelemy, C., Loquet, G., Bonnet, P., 2001. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 71–79.
- Lataye, R., Campo, P., Loquet, G., 2000. Combined effects of noise and styrene exposure on hearing function in the rat. *Hear. Res.* 139, 86–96.
- Lehnhardt, E., 1965. Occupational damages of the ear. *Arch. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd.* 185, 465–468.
- Leonova, E.V., Raphael, Y., 1997. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear. Res.* 113, 14–28.
- Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2006. *Berne y Levy Fisiologia*. Elsevier España.
- Li, L., Nevill, G., Forge, A., 1995. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J. Comp. Neurol.* 355, 405–417. <https://doi.org/10.1002/cne.903550307>
- Liberman, M.C., Dodds, L.W., 1987. Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: Serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear. Res.* 26, 45–64. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(87\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0378-5955(87)90035-9)
- Liberman, M.C., Guinan, J.J., 1998. Feedback control of the auditory periphery: anti-masking effects of middle ear muscles vs. olivocochlear efferents. *J. Commun. Disord.* 31, 471–482; quiz 483; 553.
- Liberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>
- Lim, D.J., 1972. Fine morphology of the tectorial membrane. Its relationship to the organ of Corti. *Arch. Otolaryngol. Chic. Ill* 1960 96, 199–215.
- Lim, D.J., Freilich, I.W., 1981. Ultrastructure of the stria vascularis, vestibular dark cells and endolymphatic sac following acute diuretic ototoxicity. *Scand. Audiol. Suppl.* 14 Suppl, 139–155.
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies– accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. <https://doi.org/10.1111/joim.12030>
- Llorens, J., Callejoa, A., Greguskea, E., Marotoa, A., Cutillas, B., Martins-Lopes, V., 2018. Physiological assessment of vestibular function and toxicity in humans and animals. in press.
- Llorens, J., Crofton, K.M., O'Callaghan, J.P., 1993a. Administration of 3,3'-iminodipropionitrile to the rat results in region-dependent damage to the central nervous system at levels above the brain stem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1492–1498.
- Llorens, J., Dememes, D., Sans, A., 1993b. The Behavioral Syndrome Caused by 3,3'-Iminodipropionitrile and Related Nitriles in the Rat Is Associated with Degeneration of the Vestibular Sensory Hair Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 199–210. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1238>
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- Lock, E.A., Harpur, E.S., 1992. Toxicology of sensory systems: a perspective. *Hum. Exp. Toxicol.* 11, 442–448. <https://doi.org/10.1177/096032719201100602>
- Lockitch, G., 1993. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.* 26, 371–381.
- Lukas, E., 1970. Stimulation electromyography in experimental toxicology (carbon disulphide neuropathy in rats). *Med. Lav.* 61, 302–308.
- Lysakowski, A., Gaboyard-Niay, S., Calin-Jageman, I., Chatlani, S., Price, S.D., Eatock, R.A., 2011. Molecular microdomains in a sensory terminal, the vestibular calyx ending. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10101–10114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0521-11.2011>

Lysakowski, A., Goldberg, J.M., 1997. A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J. Comp. Neurol.* 389, 419–443.

## M

- Ma, W.-L.D., Young, E.D., 2006. Dorsal cochlear nucleus response properties following acoustic trauma: response maps and spontaneous activity. *Hear. Res.* 216–217, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.03.011>
- Macdonald, M.R., Harrison, R.V., Wake, M., Bliss, B., Macdonald, R.E., 1994. Ototoxicity of carboplatin: comparing animal and clinical models at the Hospital for Sick Children. *J. Otolaryngol.* 23, 151–159.
- Magnusson, A.K., Sulaiman, M.R., Dutia, M.B., Tham, R., 1998. Effects of toluene on tonic firing and membrane properties of rat medial vestibular nucleus neurones in vitro. *Brain Res.* 779, 334–337. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01233-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01233-X)
- Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2009. Toluene Can Perturb the Neuronal Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channels Involved in the Middle-Ear Reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn242>
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, F., Solinas, A., Tavera, C., Ibba, A., Tocco, M., Flore, C., Sanna Randaccio, F., 2001. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. *Brain Res. Bull.* 55, 269–275.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, P., Zambenedetti, P., Ramila, M., Zatta, P., 2006. Effect of aluminum consumption on the vestibulo-ocular reflex. *Metab. Brain Dis.* 21, 86–104. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9010-9>
- Mameli, O., Tolu, E., Melis, F., Caria, M.A., Sechi, G.P., Riu, P.L.D., 1986. Postrotatory Nystagmus During Phenytoin Treatment. *Epilepsia* 27, 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03557.x>
- Manabe, Y., Kurokawa, T., Saito, T., Saito, H., 1995. Vestibular dysfunction in noise induced hearing loss. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 519, 262–264.
- Mangiardi, D.A., McLaughlin-Williamson, K., May, K.E., Messana, E.P., Mountain, D.C., Cotanche, D.A., 2004. Progression of hair cell ejection and molecular markers of apoptosis in the avian cochlea following gentamicin treatment. *J. Comp. Neurol.* 475, 1–18. <https://doi.org/10.1002/cne.20129>
- Martínez-Rodríguez, R., García Lorenzo, J., Bellido Peti, J., Palou Redorta, J., Gómez Ruiz, J.J., Villavicencio Mavrich, H., 2007. Loop diuretics and ototoxicity. *Actas Urol. Esp.* 31, 1189–1192.
- Masuda, Y., Yasoshima, M., Nakayama, N., 1986. Early, selective and reversible suppression of cytochrome P-450-dependent monooxygenase of liver microsomes following the administration of low doses of carbon disulfide in mice. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3941–3947.
- Matsui, J.I., Gale, J.E., Warchol, M.E., 2004. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J. Neurobiol.* 61, 250–266. <https://doi.org/10.1002/neu.20054>
- McCabe, B.F., Lawrence, M., 1958. The effects of intense sound on the non-auditory labyrinth. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 49, 147–157.
- McFadden, D., 1986. The Curious Half-Octave Shift: Evidence for a Basalward Migration of the Traveling-Wave Envelope with Increasing Intensity, in: *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, NATO ASI Series. Springer, Boston, MA, pp. 295–312. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4_21)

- McKee, R., 1942. A quantitative microchemical colorimetric determination of CS<sub>2</sub> in air, water and biological materials. *J Ind Hyg Toxicol* 151–158.
- McKenna, M.J., DiStefano, V., 1977a. Carbon disulfide. I. The metabolism of inhaled carbon disulfide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202, 245–252.
- McKenna, M.J., DiStefano, V., 1977b. Carbon disulfide. II. A proposed mechanism for the action of carbon disulfide on dopamine beta-hydroxylase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202, 253–266.
- Meiteles, L.Z., Raphael, Y., 1994. Scar formation in the vestibular sensory epithelium after aminoglycoside toxicity. *Hear. Res.* 79, 26–38.
- Meyer, R.E., Aldrich, T.E., Easterly, C.E., 1989. Effects of noise and electromagnetic fields on reproductive outcomes. *Environ. Health Perspect.* 81, 193–200.
- Mills, J.H., 1973a. Threshold shifts produced by exposure to noise in chinchillas with noise-induced hearing losses. *J. Speech Hear. Res.* 16, 700–708.
- Mills, J.H., 1973b. Temporary and permanent threshold shifts produced by nine-day exposures to noise. *J. Speech Hear. Res.* 16, 426–438.
- Mills, J.H., Adkins, W.Y., Gilbert, R.M., 1981. Temporary threshold shifts produced by wideband noise. *J. Acoust. Soc. Am.* 70, 390–396.
- Mills, J.H., Gilbert, R.M., Adkins, W.Y., 1979. Temporary threshold shifts in humans exposed to octave bands of noise for 16 to 24 hours. *J. Acoust. Soc. Am.* 65, 1238–1248.
- Møller, A.R., 2006. *Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System.* Academic Press.
- Monaco, S., Wongmongkolrit, T., Shearson, C.M., Patton, A., Schaetzle, B., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., Sayre, L.M., 1990. Giant axonopathy characterized by intermediate location of axonal enlargements and acceleration of neurofilament transport. *Brain Res.* 519, 73–81.
- Montaguti, M., Brandolini, C., Ferri, G.G., Hatzopoulos, S., Prete, A., Pession, A., 2002. Cisplatin and carboplatin-induced ototoxicity in children: clinical aspects and perspectives for prevention. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Otorinolaringol. E Chir. Cerv.-facc.* 22, 14–18.
- Moorman, M.P., Sills, R.C., Collins, B.J., Morgan, D.L., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: II. Toxicokinetics. *Neurotoxicology* 19, 89–97.
- Morata, T., Dunn, D.E., Kretschmer, L.W., Lemasters, G.K., Keith, R.W., 1993. Effects of occupational exposure to organic solvents and noise on hearing. *Scand. J. Work. Environ. Health* 19, 245–254.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Morata, T.C., Nylén, P., Johnson, A.C., Dunn, D.E., 1995. Auditory and vestibular functions after single or combined exposure to toluene: a review. *Arch. Toxicol.* 69, 431–443.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moschovakis, A.K., 1997. The neural integrators of the mammalian saccadic system. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d552–577.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol.* 34. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182814d4a>
- Moser, V.C., Phillips, P.M., Morgan, D.L., Sills, R.C., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: VII. Behavioral evaluations using a functional observational battery. *Neurotoxicology* 19, 147–157.
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.

- Mulroy, M.J., Henry, W.R., McNeil, P.L., 1998. Noise-induced transient microlesions in the cell membranes of auditory hair cells. *Hear. Res.* 115, 93–100.
- Mulroy, M.J., Whaley, E.A., 1984. Structural changes in auditory hairs during temporary deafness. *Scan. Electron Microsc.* 831–840.
- Münzel, T., Gori, T., Babisch, W., Basner, M., 2014. Cardiovascular effects of environmental noise exposure. *Eur. Heart J.* 35, 829–836. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu030>
- Murofushi, T., Curthoys, I.S., Topple, A.N., Colebatch, J.G., Halmagyi, G.M., 1995. Responses of guinea pig primary vestibular neurons to clicks. *Exp. Brain Res.* 103, 174–178.
- Murofushi, T., Matsuzaki, M., Wu, C.H., 1999. Short tone burst-evoked myogenic potentials on the sternocleidomastoid muscle: are these potentials also of vestibular origin? *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125, 660–664.

## N

- Nicotera, T.M., Hu, B.H., Henderson, D., 2003. The Caspase Pathway in Noise-Induced Apoptosis of the Chinchilla Cochlea. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 466–477. <https://doi.org/10.1007/s10162-002-3038-2>
- Nies, E., 2012. Ototoxic Substances at the Workplace: a Brief Update. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63, 147–152. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2199>
- Niklasson, M., Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., 1993. Effects of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo- and opto-oculo motor system in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15, 327–334. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90034-L](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90034-L)
- Nikolov, Z., 1974. Hearing reduction caused by manganese and noise. *JFORL J. Francais Oto-Rhino-Laryngol. Audiophonol. Chir. Maxillo-Faciale* 23, 231–234.
- Nylén, P., Larsby, B., Johnson, A.C., Eriksson, B., Höglund, G., Tham, R., 1991. Vestibular-oculomotor, opto-oculomotor and visual function in the rat after long-term inhalation exposure to toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 111, 36–43.

## O

- Odkvist, L., Bergholtz, L., Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Edling, C., 1985. Solvent-induced central nervous system disturbances appearing in hearing and vestibulo-oculomotor test. *Clin. Ecol.* 3(3), 149–153.
- Odkvist, L.M., Larsby, B., Tham, R., Aschan, G., 1979. On the mechanism of vestibular disturbances caused by industrial solvents. *Adv. Otorhinolaryngol.* 25, 167–172.
- Oghalai, J.S., Brownell, W.E., 2012. Chapter 44. Anatomy & Physiology of the Ear, in: Lalwani, A.K. (Ed.), *CURRENT Diagnosis & Treatment in Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. The McGraw-Hill Companies, New York, NY.
- Ohlemiller, K.K., Wright, J.S., Dugan, L.L., 1999. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol. Neurotol.* 4, 229–236. <https://doi.org/10.1159/000013846>
- Oosterveld, W.J., Polman, A.R., Schoonheydt, J., 1982. Vestibular implications of noise-induced hearing loss. *Br. J. Audiol.* 16, 227–232.

- Opacka, J., Baranski, B., Wrońska-Nofer, T., 1984. Effect of alcohol intake on some disturbances induced by chronic exposure to carbon disulphide in rats. I. Behavioural alterations. *Toxicol. Lett.* 23, 91–97.
- Ossenkopp, K.P., Prkacin, A., Hargreaves, E.L., 1990. Sodium arsanilate-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 875–881.

## P

- Pahor, A.L., 1979. Blast injuries to the ear: an historical and literary review. *J. Laryngol. Otol.* 93, 225–251.
- Paige, G.D., 1983a. Vestibuloocular reflex and its interactions with visual following mechanisms in the squirrel monkey. I. Response characteristics in normal animals. *J. Neurophysiol.* 49, 134–151. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.1.134>
- Paige, G.D., 1983b. Vestibuloocular reflex and its interactions with visual following mechanisms in the squirrel monkey. II. Response characteristics and plasticity following unilateral inactivation of horizontal canal. *J. Neurophysiol.* 49, 152–168. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.1.152>
- Paige, G.D., 1991. Linear vestibulo-ocular reflex (LVOR) and modulation by vergence. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 481, 282–286.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pelekis, M., Krishnan, K., 1997. Assessing the relevance of rodent data on chemical interactions for health risk assessment purposes: a case study with dichloromethane-toluene mixture. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 25, 79–86. <https://doi.org/10.1006/rtph.1996.1075>
- Perez, R., Freeman, S., Cohen, D., Sohmer, H., 2002. Functional Impairment of the Vestibular End Organ Resulting From Impulse Noise Exposure. *The Laryngoscope* 112, 1110–1114. <https://doi.org/10.1097/00005537-200206000-00032>
- Pickles, J.O., Comis, S.D., Osborne, M.P., 1984. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear. Res.* 15, 103–112. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(84\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0378-5955(84)90041-8)
- Pilz, P.K., Ostwald, J., Kreiter, A., Schnitzler, H.U., 1997. Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* 105, 171–182.
- Ping Yang, W., Henderson, D., Hua Hu, B., Nicotera, T.M., 2004. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear. Res.*, 40th Inner Ear Biology (IEB) Workshop 196, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.04.015>
- Pla, C.M., 2011. *Fisiología Médica: Del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Pocock, G., Richards, C.D., 2005. *Fisiología humana: la base de la medicina*. Elsevier España.
- Pompeiano, O., 2006. The vestibulo-ocular and the vestibulospinal reflexes: noradrenergic influences on the plastic changes which affect the cerebellar cortex during vestibular adaptation. *Arch. Ital. Biol.* 144, 197–253.

- Pouyatos, B., Gearhart, C.A., Fechter, L.D., 2005. Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.015>
- Pouyatos, B., Morel, G., Lambert-Xolin, A.-M., Maguin, K., Campo, P., 2004. Consequences of noise- or styrene-induced cochlear damages on glutamate decarboxylase levels in the rat inferior colliculus. *Hear. Res.* 189, 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00394-0)
- Precht, W., 1979. Vestibular mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 2, 265–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.02.030179.001405>
- Prosen, C.A., Petersen, M.R., Moody, D.B., Stebbins, W.C., 1978. Auditory thresholds and kanamycin-induced hearing loss in the guinea pig assessed by a positive reinforcement procedure. *J. Acoust. Soc. Am.* 63, 559–566.
- Pryor, G.T., Rebert, C.S., Howd, R.A., 1987. Hearing loss in rats caused by inhalation of mixed xylenes and styrene. *J. Appl. Toxicol. JAT* 7, 55–61.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., 2007. *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Pyykkö, I., Aalto, H., Ylikoski, J., 1989. Does impulse noise induce vestibular disturbances? *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 468, 211–216.

## Q

- Quinn, K.J., Rude, S.A., Brettler, S.C., Baker, J.F., 1998. Alterations in rat horizontal vestibulo-ocular reflex phase as a function of orientation in gravity. *J. Gravitational Physiol. J. Int. Soc. Gravitational Physiol.* 5, 41–49.

## R

- Rancz, E.A., Moya, J., Drawitsch, F., Brichta, A.M., Canals, S., Margrie, T.W., 2015. Widespread Vestibular Activation of the Rodent Cortex. *J. Neurosci.* 35, 5926–5934. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1869-14.2015>
- Raphael, Y., Altschuler, R.A., 1991. Reorganization of cytoskeletal and junctional proteins during cochlear hair cell degeneration. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 215–227. <https://doi.org/10.1002/cm.970180307>
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–41.
- Rebert, C.S., Sorenson, S.S., Pryor, G.T., 1986. Effects of intraperitoneal carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Fischer-344 rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 543–549.
- Ricci, A.J., Cochran, S.L., Rennie, K.J., Correia, M.J., 1997. Vestibular type I and type II hair cells. 2: Morphometric comparisons of dissociated pigeon hair cells. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* 7, 407–420.
- Richter, R., 1945. Degeneration of the basal ganglia in monkeys from chronic carbon disulfide poisoning. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 4, 324–353.
- Robertson, D., 1983. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9, 263–278.
- Robles, L., Ruggero, M.A., 2001. Mechanics of the Mammalian Cochlea. *Physiol. Rev.* 81, 1305–1352.



- Roh, J., Kim, C.N., Lim, N.G., Chang, J.H., Cho, Y.B., 1999. Simultaneous analysis of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide as a biological exposure index for carbon disulfide exposure. *Yonsei Med. J.* 40, 265–272. <https://doi.org/10.3349/ymj.1999.40.3.265>
- Rosowski, J.J., 1991. The effects of external- and middle-ear filtering on auditory threshold and noise-induced hearing loss. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 124–135.
- Rúa, F., Buffard, M., Sedó-Cabezón, L., Hernández-Mir, G., Torre, A. de la, Saldaña-Ruíz, S., Chabbert, C., Bayona, J.M., Messeguer, A., Llorens, J., 2013. Vestibulotoxic Properties of Potential Metabolites of Allylnitrile. *Toxicol. Sci.* 135, 182–192. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft127>
- Ruan, Q., Ao, H., He, J., Chen, Z., Yu, Z., Zhang, R., Wang, J., Yin, S., 2014. Topographic and quantitative evaluation of gentamicin-induced damage to peripheral innervation of mouse cochleae. *Neurotoxicology* 40, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.002>
- Rubel, E.W., Furrer, S.A., Stone, J.S., 2013. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear. Res.* 297, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.12.014>
- Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R., Puel, J.-L., 2007. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear. Res.* 227, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.08.017>
- Ruijten, M.W., Sallé, H.J., Verberk, M.M., 1993. Verification of effects on the nervous system of low level occupational exposure to CS<sub>2</sub>. *Br. J. Ind. Med.* 50, 301–307.
- Rybak, L.P., Ramkumar, V., 2007. Ototoxicity. *Kidney Int.* 72, 931–935. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002434>

## S

- Saldaña-Ruíz, S., Hernández-Mir, G., Sedó-Cabezón, L., Cutillas, B., Llorens, J., 2012. Vestibular toxicity of cis-2-pentenitrile in the rat. *Toxicol. Lett.* 211, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.010>
- Salt, A.N., 2004. Acute endolymphatic hydrops generated by exposure of the ear to nontraumatic low-frequency tones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4032-z>
- Salt, A.N., Hullar, T.E., 2010. Responses of the ear to low frequency sounds, infrasound and wind turbines. *Hear. Res.* 268, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.06.007>
- Sandrini, G., Bosso, A., Biscaldi, G., Malamani, T., Franco, G., Grampella, D., Alfonsi, E., Moglia, A., Arrigo, A., 1983. Electromyographic investigation in early diagnosis of carbon disulphide neuropathy: a study on 216 workers with different degrees of exposure. *G. Ital. Med. Lav.* 5, 199–202.
- Schacht, J., Hawkins, J.E., 2006. Sketches of otohistory. Part 11: Ototoxicity: drug-induced hearing loss. *Audiol. Neurotol.* 11, 1–6. <https://doi.org/10.1159/000088850>
- Schacht, J., Talaska, A.E., Rybak, L.P., 2012. Cisplatin and Aminoglycoside Antibiotics: Hearing Loss and Its Prevention. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 295, 1837–1850. <https://doi.org/10.1002/ar.22578>
- Schust, M., 2004. Effects of low frequency noise up to 100 Hz. *Noise Health* 6, 73–85.
- Schwartz, I.R., Ryan, A.F., 1986. Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: an electron microscopic autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 246, 500–512. <https://doi.org/10.1002/cne.902460407>

- Sedó-Cabezón, L. Estudi d'un Model d'Exposició Subcrònica a IDPN en la Rata: Patologia Vestibular i Reparació, 2015. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Sedó-Cabezón, L., Boadas-Vaello, P., Soler-Martín, C., Llorens, J., 2014. Vestibular damage in chronic ototoxicity: A mini-review. *NeuroToxicology, neurodevelopmental basis of Health and disease. The 14th Meeting of the International Neurotoxicology Association* 43, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.009>
- Sedó-Cabezón, L., Jedynak, P., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2015. Transient alteration of the vestibular calyceal junction and synapse in response to chronic ototoxic insult in rats. *Dis. Model. Mech.* 8, 1323–1337. <https://doi.org/10.1242/dmm.021436>
- Sekiya, T., Kojima, K., Matsumoto, M., Holley, M.C., Ito, J., 2007. Rebuilding lost hearing using cell transplantation. *Neurosurgery* 60, 417–433; discussion 433. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000249189.46033.42>
- Seoane, A., Apps, R., Balbuena, E., Herrero, L., Llorens, J., 2005. Differential effects of trans-crotononitrile and 3-acetylpyridine on inferior olive integrity and behavioural performance in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 22, 880–894. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04230.x>
- Seoane, A., Demêmes, D., Llorens, J., 2001. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. *J. Comp. Neurol.* 439, 385–399.
- Seoane, A., Llorens, J., 2005. Extruding auditory hair cells in rats exposed to subchronic 3,3'-iminodipropionitrile. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 571–574. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.021>
- Shaffer, L.A., Withnell, R.H., Dhar, S., Lilly, D.J., Goodman, S.S., Harmon, K.M., 2003. Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear Hear.* 24, 367–379. <https://doi.org/10.1097/01.AUD.0000090439.16438.9F>
- Shi, X., Gillespie, P.G., Nuttall, A.L., 2005. Na<sup>+</sup> influx triggers bleb formation on inner hair cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1332–C1341. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00522.2004>
- Sills, R.C., Harry, G.J., Morgan, D.L., Valentine, W.M., Graham, D.G., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: V. Morphology of axonal swelling in the muscular branch of the posterior tibial nerve and spinal cord. *Neurotoxicology* 19, 117–127.
- Sills, R.C., Valentine, W.M., Moser, V., Graham, D.G., Morgan, D.L., 2000. Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol. Pathol.* 28, 142–148. <https://doi.org/10.1177/019262330002800118>
- Silverthorn, D.U., 2008. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado* 4a edición. Ed. Médica Panamericana.
- Simmons, D.D., Liberman, M.C., 1988a. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270, 132–144. <https://doi.org/10.1002/cne.902700111>
- Simmons, D.D., Liberman, M.C., 1988b. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: II. Electron microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270, 145–154. <https://doi.org/10.1002/cne.902700112>
- Simmons, D.D., Manson-Gieseke, L., Hendrix, T.W., McCarter, S., 1990. Reconstructions of efferent fibers in the postnatal hamster cochlea. *Hear. Res.* 49, 127–139.
- Simon, P., Nicot, T., 1993. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid in urine. *J. Chromatogr.* 620, 47–53.



- Slepecky, N.B., 1996. Structure of the Mammalian Cochlea, in: *The Cochlea*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer, New York, NY, pp. 44–129. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0757-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0757-3_2)
- Smith, C.A., Sjostrand, F.S., 1961. Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 523–556.
- Smookler, H.H., Buckley, J.P., 1969. Relationships between brain catecholamine synthesis, pituitary adrenal function and the production of hypertension during prolonged exposure to environmental stress. *Int. J. Neuropharmacol.* 8, 33–41.
- Snyder-Halpern, R., 1985. The effect of critical care unit noise on patient sleep cycles. *CCQ.* 7, 41–51.
- Sobkowicz, H.M., August, B.K., Slapnick, S.M., 1997. Cellular interactions as a response to injury in the organ of Corti in culture. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 15, 463–485.
- Soler-Martín, C., Díez-Padrís, N., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 96, 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl186>
- Sousa, A.D., Andrade, L.R., Salles, F.T., Pillai, A.M., Buttermore, E., Bhat, M.A., Kachar, B., 2009. The Septate Junction Protein Caspr is Required for Structural Support and Retention of KCNQ4 at Calyceal Synapses of Vestibular Hair Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3103–3108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4868-08.2009>
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977a. Neurotoxic properties of certain aliphatic hexacarbons. *Proc. R. Soc. Med.* 70, 37–39.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977b. Ultrastructural studies of the dying-back process. III. The evolution of experimental peripheral giant axonal degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 36, 276–299.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1977c. Ultrastructural studies of the dying-back process. IV. Differential vulnerability of PNS and CNS fibers in experimental central-peripheral distal axonopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 36, 300–320.
- Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., 1980. Recent morphological studies of toxic neuropathy. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 8, 3–11.
- Staecker, H., Van De Water, T.R., 1998. Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 480–487.
- Stanfield, C., 2011. *Principios de fisiología humana*, 4th ed. Pearson.
- Stevin, G.O., 1986. Simulation of the Middle Ear Acoustic Reflex Applied to Damage-Risk for Hearing Produced by Burst Fire, in: *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, NATO ASI Series. Springer, Boston, MA, pp. 271–280. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4_19)
- Stewart, C., Yu, Y., Huang, J., Maklad, A., Tang, X., Allison, J., Mustain, W., Zhou, W., Zhu, H., 2016. Effects of high intensity noise on the vestibular system in rats. *Hear. Res.* 335, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.03.002>
- Stewart, C.E., Kanicki, A.C., Altschuler, R.A., King, W.M., 2017. Vestibular short latency evoked potential (VsEP) is abolished by low frequency noise exposure in rats. *J. Neurophysiol.* jn.00668.2017. <https://doi.org/10.1152/jn.00668.2017>
- Steyger, P.S., Burton, M., Hawkins, J.R., Schuff, N.R., Baird, R.A., 1997. Calbindin and parvalbumin are early markers of non-mitotically regenerating hair cells in the bullfrog vestibular otolith organs. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 15, 417–432.
- Straka, H., Vibert, N., Vidal, P.P., Moore, L.E., Dutia, M.B., 2005. Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Prog. Neurobiol.* 76, 349–392. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.10.002>

- Stypulkowski, P.H., 1990. Mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear. Res.* 46, 113–145.
- Subramaniam, M., Campo, P., Henderson, D., 1991. Development of resistance to hearing loss from high frequency noise. *Hear. Res.* 56, 65–68.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Sobczak, Z., Józwiak, Z., 1992. The statokinesiometry in evaluation of the balance system in persons with chronic carbon disulphide intoxication. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health* 5, 265–276.
- Sulsky, S., Hooven, F., Burch, M., Mundt, K., 2002. Critical review of the epidemiological literature on the potential cardiovascular effects of occupational carbon disulfide exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, 365–380. <https://doi.org/10.1007/s00420-001-0309-x>
- Suzuki, M., Yamasoba, T., Ishibashi, T., Miller, J.M., Kaga, K., 2002. Effect of noise exposure on blood-labyrinth barrier in guinea pigs. *Hear. Res.* 164, 12–18.

## T

- Tabuchi, K., Pak, K., Chavez, E., Ryan, A.F., 2007. Role of inhibitor of apoptosis protein in gentamicin-induced cochlear hair cell damage. *Neuroscience* 149, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.061>
- Takebayashi, T., Omae, K., Ishizuka, C., Nomiyama, T., Sakurai, H., 1998. Cross sectional observation of the effects of carbon disulphide on the nervous system, endocrine system, and subjective symptoms in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.* 55, 473–479.
- Takimoto, Y., Imai, T., Kondo, M., Hanada, Y., Uno, A., Ishida, Y., Kamakura, T., Kitahara, T., Inohara, H., Shimada, S., 2016. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibulo-ocular reflex. *Toxicol. Lett.* 262, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.009>
- Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M., 2012. Chronic Exposure to Low Frequency Noise at Moderate Levels Causes Impaired Balance in Mice. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039807>
- Tascioglu, A.B., 2005. Brief review of vestibular system anatomy and its higher order projections. *J Neuroanat* 4, 24–27.
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Bunnfors, I., Odkvist, L., Liedgren, C., 1982. Electronystagmographic findings in rats exposed to styrene or toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 93, 107–112.
- The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Noise and Hearing Loss, 1990. URL <https://consensus.nih.gov/1990/1990NoiseHearingLoss076html.htm> (accessed 12.19.17).
- Thienpont, L.M., Depourcq, G.C., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 1990. Liquid chromatographic determination of 2-thioxothiazolidine-4-carboxylic acid isolated from urine by affinity chromatography on organomercurial agarose gel. *Anal. Chem.* 62, 2673–2675. <https://doi.org/10.1021/ac00223a005>
- Tighilet, B., Leonard, J., Bernard-Demanze, L., Lacour, M., 2015. Comparative analysis of pharmacological treatments with N-acetyl-DL-leucine (Tanganil) and its two isomers (N-acetyl-L-leucine and N-acetyl-D-leucine) on vestibular compensation: Behavioral investigation in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 769, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.041>
- Tilney, L.G., Tilney, M.S., 1986. Functional organization of the cytoskeleton. *Hear. Res.* 22, 55–77.

- Tilson, H.A., Mitchell, C.L., 1984. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 425–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.002233>
- Tolonen, M., Hänninen, H., 1978. Psychological tests specific to individual carbon disulfide exposure. *Scand. J. Psychol.* 19, 241–245.
- Tresguerres, J.A.F., Hernández, J.Á.F.-T., 2006. *Fisiología humana*. McGraw-Hill Interamericana.

## U

- Usami, S., Takumi, Y., Fujita, S., Shinkawa, H., Hosokawa, M., 1997. Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res.* 747, 147–150.

## V

- van den Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., Marres, E.H., 1990. Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* 48, 209–219.
- van den Berge, H., van der Wal, J.C., 1990. The innervation of the middle ear muscles of the rat. *J. Anat.* 170, 99–109.
- van den Berge, H., Wirtz, P., 1989a. Detailed morphology of the stapedius muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 166, 157–169.
- van den Berge, H., Wirtz, P., 1989b. Detailed morphology of the tensor tympani muscle of the rat. An integrated light microscopical, morphometrical, histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study in relation to function. *J. Anat.* 164, 215–228.
- Vasilescu, C., Florescu, A., 1980. Clinical and electrophysiological studies of carbon disulphide polyneuropathy. *J. Neurol.* 224, 59–70.
- Vasiljeva, I., 1973. Effect of low concentrations of carbon disulfide and hydrogen sulfide on the menstrual function in women and on the estrous cycle under experimental conditions. *Gig Sanit* 38(7), 24–27.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Cour, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.02.003>
- Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Rieger, B., Thomas, A., Cour, C., 2011. Neuronal Circuits Involved in the Middle-Ear Acoustic Reflex. *Toxicol. Sci.* 119, 146–155. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq312>
- Vernon, J., Brummett, R., Brown, R., 1977. Noise trauma induced in the presence of loop-inhibiting diuretics. *Trans. Sect. Otolaryngol. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 84, 407–413.
- von Békésy, G., 1935. Über akustische Reizung des Vestibularapparates. *Pflüger's Arch Ges Physiol* 236, 59–76.
- von Békésy, G., 1960. *Experiments in Hearing*, in: McGraw-Hill. New-York.

- Vyskocil, A., Truchon, G., Leroux, T., Lemay, F., Gendron, M., Gagnon, F., Majidi, N.E., Boudjerida, A., Lim, S., Emond, C., Viau, C., 2012. A weight of evidence approach for the assessment of the ototoxic potential of industrial chemicals. *Toxicol. Ind. Health* 28, 796–819. <https://doi.org/10.1177/0748233711425067>

## W

- Wang, J., Ladrech, S., Pujol, R., Brabet, P., Van De Water, T.R., Puel, J.-L., 2004. Caspase inhibitors, but not c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res.* 64, 9217–9224. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1581>
- Wang, J.-M., Li, B.-C., Chen, L., Wang, G.-B., Sun, H., Chen, Z., Zhang, L.-C., 2006. Cell death-inducing DFF45-like effector may take part in neuronal apoptosis of the lumbar spinal cord after sciatic nerve injury caused by a firearm. *Mil. Med.* 171, 793–799.
- Wang, Y., Hirose, K., Liberman, M.C., 2002. Dynamics of Noise-Induced Cellular Injury and Repair in the Mouse Cochlea. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 3, 248–268. <https://doi.org/10.1007/s101620020028>
- Warr, W.B., Guinan, J.J., 1979. Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res.* 173, 152–155. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)91104-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)91104-1)
- Wathier, L., Venet, T., Thomas, A., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., Campo, P., Tsan, P., Bouguet-Bonnet, S., Gansmüller, A., 2016. Membrane fluidity does not explain how solvents act on the middle-ear reflex. *Neurotoxicology* 57, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.08.001>
- Waye, K.P., Bengtsson, J., Rylander, R., Hucklebridge, F., Evans, P., Clow, A., 2002. Low frequency noise enhances cortisol among noise sensitive subjects during work performance. *Life Sci.* 70, 745–758.
- Wennmo, C., Henriksson, N.G., Pyykkö, I., Schalén, L., 1981. Eye-velocity programming in brain-stem disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 374, 774–783.
- Wersäll, J., Bagger-Sjöbäck, D., 1974. Morphology of the Vestibular Sense Organ, in: *Vestibular System Part 1: Basic Mechanisms, Handbook of Sensory Physiology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 123–170. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-65942-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-65942-3_4)
- Wersäll, J., Björkroth, B., Flock, A., Lundquist, P.G., 1973. Experiments on ototoxic effects of antibiotics. *Adv. Otorhinolaryngol.* 20, 14–41.
- Whitworth, C.A., Hudson, T.E., Rybak, L.P., 1999. The effect of combined administration of cadmium and furosemide on auditory function in the rat. *Hear. Res.* 129, 61–70.
- Wright, A., 1981a. Scanning electron microscopy of the normal human cochlea. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 6, 237–244.
- Wright, A., 1981b. Scanning electron microscopy of the human cochlea--the organ of Corti. *Arch. Otorhinolaryngol.* 230, 11–19.

## X

- Xu, L., Zhou, L., Li, P., 2012. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1094–1098. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241489>

## Y

- Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K., 2000. The stereoselective effects of ketamine isomers on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Anesth. Analg.* 91, 225–229.
- Yamamura, K., Terayama, K., Yamamoto, N., Kohyama, A., Kishi, R., 1989. Effects of acute lead acetate exposure on adult guinea pigs: electrophysiological study of the inner ear. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 13, 509–515.
- Yamasoba, T., Goto, Y.-I., Komaki, H., Mimaki, M., Sudo, A., Suzuki, M., 2006. Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 395, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.045>
- Ylikoski, J., 1987. Impulse noise induced damage in the vestibular end organs of the guinea pig. A light microscopic study. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 103, 415–421.
- Ylikoski, J., Juntunen, J., Matikainen, E., Ylikoski, M., Ojala, M., 1988. Subclinical vestibular pathology in patients with noise-induced hearing loss from intense impulse noise. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 105, 558–563.
- Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M., Inoko, H., 2011. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol. Biosyst.* 7, 91–100. <https://doi.org/10.1039/c0mb00099j>
- Young, J.S., Fechter, L.D., 1986. Trimethyltin exposure produces an unusual form of toxic auditory damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82, 87–93.

## Z

- Zenner, H.P., Reuter, G., Zimmermann, U., Gitter, A.H., Fermin, C., LePage, E.L., 1994. Transitory endolymph leakage induced hearing loss and tinnitus: depolarization, biphasic shortening and loss of electromotility of outer hair cells. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 251, 143–153.
- Zhao, Y., Yamoah, E.N., Gillespie, P.G., 1996. Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15469–15474.
- Zheng, G., Hu, B.H., 2012. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea. *BMC Neurosci.* 13, 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-71>
- Zhu, H., Tang, X., Wei, W., Maklad, A., Mustain, W., Rabbitt, R., Highstein, S., Allison, J., Zhou, W., 2014. Input-output functions of vestibular afferent responses to air-conducted clicks in rats. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 15, 73–86. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0428-6>
- Zhu, H., Tang, X., Wei, W., Mustain, W., Xu, Y., Zhou, W., 2011. Click-evoked responses in vestibular afferents in rats. *J. Neurophysiol.* 106, 754–763. <https://doi.org/10.1152/jn.00003.2011>
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57–70.
- Zimmermann, K.C., Green, D.R., 2001. How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, S99–103.
- Zwislocki, J.J., 1984. How OHC lesions can lead to neural cochlear hypersensitivity. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 97, 529–534.

## URLgrafia

Dreamstime. URL: <https://www.dreamstime.com/>

Spring. URL: <http://droualb.faculty.mjc.edu/>

[http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%205/special\\_senses%20Spring%202007%20with%20figures.htm](http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%205/special_senses%20Spring%202007%20with%20figures.htm)

Voyage au centre de l'audition. URL: <http://www.cochlea.eu/>

What – When – How. URL: <http://what-when-how.com/neuroscience/auditory-and-vestibular-systems-sensory-system-part-1>



## **9. ANNEXES**





## 9.1 Annex 1: Protocol de supervisió dels animals

En tots els procediments experimentals, i especialment en aquells amb una severitat mitja o alta, s'ha d'incloure un protocol de supervisió dels animals que permeti aplicar mesures pal·liatives del dolor, com la utilització d'analgèsics o el sacrifici per raons humanitàries.

Un dels protocols més útils és el proposat per Morton i Griffiths, 1985. Aquest protocol de supervisió permet qualificar el dolor causat per un procediment.

El protocol de supervisió dels animals modificat per aquest experiment és el següent:

### Feuille d'observation des animaux après administration d'un toxique

Toxique étudié : Disulfure de carbone (CS<sub>2</sub>)

Voie d'administration : Voie inhalatoire

Protocole d'exposition :

Dose :

Date d'exposition :

Evaluation des effets : Effet prononcé: +; Absence d'effet : -; effet constaté +/- prononcé : +/- ; (seuls 4 rats/8 pourront être observés dans une cage d'exposition)

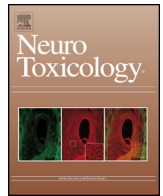
### Nom de l'observateur et date observation :

	Dose															
	Au cours de l'exposition								1h après fin d'exposition							
<b>Rat</b>																
Poils hérissés																
Yeux mi-clos																
Troubles respiratoires et durée cas échéant																
Signes d'agitation																
Tremblements																
Troubles de l'équilibre																
Mouvements de tête																
Commentaires																

### Points limites procédure exposition du projet MCN-08 :

Points limites en cours d'exposition	Points limites après sortie des cages (1 h après environ)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dyspnée pendant au moins plusieurs minutes</li> <li>- Convulsions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perte de poids de 20 % après 4 semaines d'exposition/groupe témoins</li> </ul>





## Full Length Article

## Carbon disulfide potentiates the effects of impulse noise on the organ of Corti



Maria Carreres Pons<sup>a,c</sup>, Monique Chalansonnet<sup>a</sup>, Thomas Venet<sup>a</sup>, Aurélie Thomas<sup>a</sup>,  
Hervé Nunge<sup>a</sup>, Lise Merlen<sup>a</sup>, Frédéric Cosnier<sup>a</sup>, Jordi Llorens<sup>c,d</sup>, Pierre Campo<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France

<sup>b</sup> DevAH EA 3450-Développement, Adaptation et Handicap, Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine, F-54500 Vandœuvre, France

<sup>c</sup> Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 December 2016

Received in revised form 7 February 2017

Accepted 7 February 2017

Available online 8 February 2017

## Keywords:

Impulse noise

Carbon disulfide

Middle-ear reflex

Combined exposure

Rats

Risk assessment

## ABSTRACT

Occupational noise can damage workers' hearing, and the phenomenon is even more dangerous when noise is associated with an ototoxic solvent. Aromatic solvents are known to provoke chemical-induced hearing loss, but little is known about the effects on hearing of carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) when combined with noise. Co-exposure to CS<sub>2</sub> and noise may have a harmful effect on hearing, but the mechanisms involved are not well understood. For instance, CS<sub>2</sub> is not thought to have a cochleotoxic effect, but rather it is thought to cause retrocochlear hearing impairment. In other words, CS<sub>2</sub> could have a distal neuropathic effect on the auditory pathway. However, a possible pharmacological effect of CS<sub>2</sub> on the central nervous system (CNS) has never been mentioned in the literature. The aim of this study was to assess, in rats, the effects of a noise (continuous vs. impulse), associated with a low concentration of CS<sub>2</sub> [(short-term threshold limit value) x 10 as a safety factor] on the peripheral auditory receptor. The noise, whatever its nature, was an octave band noise centered at 8 kHz, and the 250-ppm CS<sub>2</sub> exposure lasted 15 min per hour, 6 h per day, for 5 consecutive days. The impact of the different experimental conditions on hearing loss was assessed using distortion product oto-acoustic emissions and histological analyses. Although the LEX,8 h (8-h time-weighted average exposure) for the impulse noise was lower (84 dB SPL) than that for the continuous noise (89 dB SPL), it appeared more damaging to the organ of Corti, in particular to the outer hair cells. CS<sub>2</sub> exposure alone did not have any effect on the organ of Corti, but co-exposure to continuous noise with CS<sub>2</sub> was less damaging than exposure to continuous noise alone. In contrast, the cochleo-traumatic effects of impulse noise were significantly enhanced by co-exposure to CS<sub>2</sub>.

Therefore, CS<sub>2</sub> can clearly modulate the middle-ear reflex function. In fact, CS<sub>2</sub> may have two distinct effects: firstly, it has a pharmacological effect on the CNS, modifying the trigger of the acoustic reflex; and secondly, it can make the organ of Corti more susceptible to impulse noise. The pharmacological effects on the CNS and the effects of CS<sub>2</sub> on the organ of Corti are discussed to try to explain the overall effect of the solvent on hearing. Once again, the results reported in this article show that the temporal structure (continuous vs. impulse) of noise should be taken into consideration as a key parameter when establishing hearing conservation regulations.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** CNS, central nervous system; dB (A), decibel weighted A; dB SPL, decibel sound pressure level; DPOAEs, distortion product oto-acoustic emissions; FFT, fast fourier transform; LEX,8 h, equivalent continuous noise level calculated over 8 h; MER, middle-ear reflex; NIHL, noise-induced hearing loss; IHC, inner hair cells; IS, internal standard; OHC, outer hair cells; SD, standard deviation; SDH, succinate dehydrogenase; SEM, scanning electron microscopy; STEL, short term exposure limit; TWA, time-weighted averages.

\* Corresponding author at: Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France.

E-mail address: pierre.campo@inrs.fr (P. Campo).

## 1. Introduction

Despite preventive regulations, noise-induced hearing loss (NIHL) remains a major occupational health hazard. Noise exposure in workplaces can be either due to continuous noise or to impulse noises. Impulse noises are characterized by high intensities over a short duration, and the stereociliae at the top of the hair cells are known to be particularly vulnerable to acoustic

injury from this type of noise (Hamernik et al., 1989). Impulse noise can provoke functional disruption of intercellular junctions in the sensory epithelium (Zheng and Hu, 2012). As far as the continuous noises are concerned, recent research has showed a possible disruption of the synaptic communication (Liberman and Kujawa, 2017; Kobel et al., 2017; Moser et al., 2013). However, the authorities do not distinguish between noise types when formulating recommendations to protect workers against NIHL. Both European and American frameworks and guidance documents for hearing conservation in workers require noise exposure to remain within certain limits:  $L_{EX,8h}$  and peak values (Directive 2003/10/EC; <http://www.worksafebc.com>). The strategy used to assess noise-related danger relies on the equal energy principle over an 8-h workday ( $L_{EX,8h}$ ), which presumes that hearing damage is mainly a function of the total acoustic energy received, not the pattern in which it arrives. Based on this assumption, the theory of conservation of acoustic energy (the 3-dB exchange rate in the European Union and the 5-dB exchange rate in the USA) should result in a constant hearing hazard whatever the type of noise. The maximum permissible noise exposure levels over an 8-h work shift are  $L_{EX,8h} = 87$  dB(A) in the European Union, and 90 dB(A) in the USA, and occupational exposure to noise must therefore be maintained below these limits. For impulse noise, peak value limits is 140 dB(C) in the European Union.

While noise remains the predominant occupational hazard to hearing, there is growing evidence that a number of chemicals used in industry, such as organic solvents, may also affect hearing, or exacerbate the effects of occupational noise (Chen and Henderson, 2009; Campo et al., 2013). The toxicological effects of co-exposure to noise and chemicals are complex, but highly relevant when it comes to assessing worker risk. Co-exposures to noise and carbon disulfide ( $CS_2$ ) are present in various industry sectors, but the most important use remains in the manufacturing of rayon and cellophane (Hodgkinson and Prasher, 2006). It can be used also as a solvent in chemical industry. Surprisingly, relatively little has been published on research into how  $CS_2$  affects hearing in workers (Morata, 1989; Chang et al., 2003) or in animals (Clerici and Fechter, 1991). As  $CS_2$  has neurotoxic effects, the threshold limit values – time-weighted averages (TWA) defined by Occupational Safety and Health Administration (OSHA) and the European agency for safety and health at work – are low: 20 and 5 ppm, respectively. However, the short-term exposure limits (STEL) are higher, 30 ppm is the ceiling value for 30 min exposure in the USA, whereas exposure is limited to a maximum of 25 ppm for 15 min in Europe. Based on these limits, the carbon disulfide concentration tested in the study presented in this paper (250 ppm) was chosen as it is 10 times (safety factor) higher than the European STEL value.

One concern of this investigation was to evaluate the relevance of the STEL values recommended in Europe and in the USA, taking a moderate safety factor into account. We also addressed the relevance of the TWA value in case of combined exposure to noise in factories. We continue to believe that it is important to take the type of noise into consideration when assessing risks to human hearing and that co-exposure to solvents should also be considered in this occupational context.

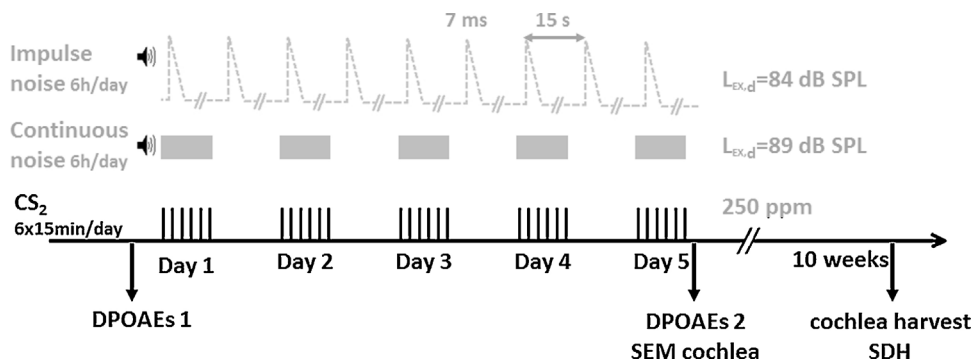
Several studies in rats have shown that solvents can have a pharmacological effect on olivocochlear nuclei. These effects explain, at least partially, the synergistic effects on hearing of combined exposure to noise and solvent (Campo et al., 2007; Wathier et al., 2016; Venet et al., 2011, 2015). For the study described in this paper, carried out in rats, two types of noise with similar spectra but different temporal structures (continuous vs. impulse) were tested to compare their impact on hearing when associated with  $CS_2$ . Impulse noise does not always trigger the middle-ear reflex (MER), and even when it does, the delay before its activation allows acoustic energy to penetrate into the cochlea. In contrast, the acoustic energy of continuous noise is significantly decreased by the protective effect of the MER (Venet et al., 2015). Therefore, the main goal of the current study was to test whether exposure to either type of noise in combination with  $CS_2$  had different effects due to perturbation of the MER in a rat's model.

In summary, the goals of this study were first, to assess the relevance of the TWA values for  $CS_2$  recommended in Europe and the USA, and second, to test whether  $CS_2$  can modify the neuropharmacology of the MER and further weaken the resistance of the organ of Corti to noises.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult female Long Evans ( $n = 78$ ) rats weighing approximately 250 g were used in experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Two rats were housed in each cage ( $1032\text{ cm}^2 \times 20\text{ cm}$  high) with irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). All animals were 16-weeks-old before starting experiments. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure periods. Animals were maintained on a 12 h/12 h day/night cycle during experiments. Room temperature and relative humidity in the animal facility were  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 10\%$ , respectively. The background noise level in the animal facilities was around 42 dB.



**Fig. 1.** Experimental protocol. The animals were exposed during 5 consecutive days for 6 h/day. Carbon disulfide ( $CS_2$ ) exposure: each bar represents a period of 15 min exposure at 250 ppm. Continuous noise exposure: each gray rectangle represents a period of 6 h continuous noise with a  $L_{EX,d}$  of 89 dB SPL. Impulse noise exposure: dotted line represents the temporal structure of the impulse noise emission. Each 7 ms pulse was separated by 15 s and this sequence was repeated during 6 h. Hearing loss was measured using the cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) before (DPOAEs1) and after the 5 days of exposure (DPOAEs2). Scanning electron micrographs (SEM): rats were sacrificed at the end of the exposures. Succinate dehydrogenase (SDH): animals were sacrificed 10 weeks after the end of the exposures.

The animal facilities are fully accredited (C54-547-10), and while conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (Directive, 2010/63/EU, 22 September 2010 Directive, 2010 Directive, 2010/63/EU, 22 September 2010). The study protocol used here was approved by the Lorraine-region ethics committee for animal experimentation (CELMEA).

## 2.2. Protocol

A schematic representation of the experimental design is shown in Fig. 1.

Animals were exposed either to noise (impulse vs. continuous) and/or to CS<sub>2</sub>. As a result, there were different groups: impulse noise, continuous noise, solvent alone, solvent + impulse noise, and, finally, solvent + continuous noise. The number of controls and exposed animals for each experiment are described in Table 1. The rats were exposed during 6 h per day, for 5 consecutive days.

The noise spectrum was an octave band noise (OBN) centered at 8 kHz. The L<sub>EX,8h</sub> for the continuous and impulse noises were 89 and 84 dB SPL, respectively. For the impulse noise, the duration of each peak lasted 7 ms and was followed by a 15-s background noise before the next peak. The solvent exposure conditions were defined as follows: 250 ppm for 15 min per hour, 6 h per day, 5 consecutive days. The same conditions were applied for combined exposures. Rats' hearing was tested with cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs). Hearing was tested before and after the 5 days of exposure. Twenty five animals were sacrificed at the end of the exposure for scanning electronic microscopy (SEM) analyses; the other animals were allowed to recover for 10 weeks in the animal facility before performing succinate dehydrogenase (SDH) analyses.

## 2.3. Anesthesia

DPOAEs were measured in animals under light anesthesia induced by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was continuously monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C.

## 2.4. Hearing tests

DPOAEs are low-level sounds generated by the cochlea and emitted by the tympanic membrane. The DPOAE procedure was performed inside a sound-attenuated booth. The custom-designed DPOAE probe consisted of two transducers generating f1 & f2 frequencies and a microphone measuring the acoustic pressure within the outer ear canal (Shaffer et al., 2003; Venet et al., 2011). The primary tones were produced by frequency synthesizers (Pulse, B&K 3110) and emitted by two miniature speakers

(Microphone, B&K type 4191). The difference between the two tones (L1–L2) was equal to 14 dB. Calibration was performed with a 1/8-inch microphone (B&K type 4138) placed in a specifically designed cavity with a volume equivalent to the rat's outer ear canal. This calibration ensured that f1 and f2 were always emitted at the target intensities. The response was measured using an FFT (Fast Fourier Transform) analyzer (B&K PULSE 3110). DPOAE amplitude was determined by averaging a linear spectrum over 4 s (N = 382); each FFT epoch lasted 31.25 ms, with a 66.7% overlap. The f1 to f2 ratio was maintained at 1.2, a ratio that has been reported to be suitable for studies with rats (Henley et al., 1990). Six couples of primary tones (f1–f2) were delivered to the left ear: (3–3.6), (4–4.8), (5–6), (8–9.6), (14.6–17.5), and (21.2–25.4) kHz. To simplify the presentation of results, hereafter each pair of primaries will be indicated only by the f2. These six couples of frequencies were chosen to surround the extent of the hearing loss induced by an octave band noise centered at 8 kHz. At this intensity, the hearing loss was expected to be half an octave above the central frequency of the noise.

Hearing was tested just prior to the 5-day exposure (DPOAEs 1) and at the end of exposure (DPOAEs 2). The hearing loss was determined by calculating the difference between the two measurements (DPOAEs 2–DPOAEs 1) for the control and exposed rats.

## 2.5. Carbon disulfide exposure

During the exposure period, all rats (controls, noise-, CS<sub>2</sub>- or noise + CS<sub>2</sub>-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain dynamic and adjustable airflow (5–6 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H<sub>2</sub>O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22 ± 1 °C and relative humidity of 55 ± 10%.

CS<sub>2</sub> vapor was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface. The vapor was transported through the streamer along with an additional airflow, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 250-ppm CS<sub>2</sub>, 15 min per hour for 6 h per day, over 5 consecutive days. Controls (n = 30) were always ventilated with fresh air.

Effective exposure levels were determined for half of the 15-min exposures by collecting samples of the chamber's atmosphere using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS<sub>2</sub> was desorbed from the adsorbent using methylene chloride. 2-butanone was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu). CS<sub>2</sub> samples were assayed on a 30 m × 0.25 mm (1 μm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard) (Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/s. The column temperature program was: 40 °C

**Table 1**

Number of control and exposed animals for each experiment. CS<sub>2</sub>: carbon disulfide. CN: continuous noise. IN: impulse noise. DPOAE: cubic distortion product oto-acoustic emissions. SEM: scanning electron micrographs. SDH: succinate dehydrogenase. Exp: exposed rats. Ctrl: control rats.

Exposure group			Hearing measurement		Histology			
			DPOAE		SEM		SDH	
			Exp	Ctrl	Exp	Ctrl	Exp	Ctrl
CS <sub>2</sub>	16	16	8	8	4	3	5	5
CN	8	7	8	10	3	3	5	5
CN + CS <sub>2</sub>	8		8		3		5	
IN	8	7	8		3	3	5	
IN + CS <sub>2</sub>	8		8		3		5	

for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 µl) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. The temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The MS was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode and ions 43 (for IS) and 76 (for CS<sub>2</sub>) were monitored. These analyses allowed daily calibrations to be performed.

During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously monitor the stability of vapor generation throughout exposure.

## 2.6. Noise exposures

Two loudspeakers were positioned in the ceiling of the exposure chambers. Whatever the nature of the noise tested (continuous or impulse), the spectrum was always an octave band noise centered at 8 kHz (8kHzOBN) (Fig. 2). The L<sub>EX,8h</sub> of the noises was chosen to obtain an equivalent level of hearing loss of approximately 5 dB with both types of noise. Preliminary experiments were used to determine the conditions producing a 5-dB difference. Based on the results of these experiments, the L<sub>EX,8h</sub> of the impulse noise was chosen as 84 dB SPL, whereas the L<sub>EX,8h</sub> of the continuous noise was determined to be 89 dB SPL.

Animals were placed in separate cells during noise exposure to avoid the creation of natural acoustic screens. The acoustic field was quite homogenous (±1 dB between the different cells). In addition, to minimize between-subject differences, the animals were positioned according to a rotating scheme. Within the chambers, the background noise was a low-frequency noise ranging from 63 Hz to 500 Hz. The noise level was approximately 50 dB. Over 500 Hz the background noise was only 30 dB.

### 2.6.1. Continuous noise

The noise intensity applied for continuous exposure was 90.2 dB SPL for 6 h, which corresponds to a L<sub>EX,8h</sub> of 89 dB SPL.

### 2.6.2. Impulse noise

Each sound burst lasted 7 ms and was separated from the following one by 15 s background noise. The sound-absorbing acoustic material placed within the exposure chambers allowed a steady sound pressure level of 116 dB SPL to be maintained for 10 ms, followed by a steep decline. Thus, 90% of the acoustic energy was dissipated within 10 ms. In these conditions, the L<sub>EX,8h</sub>, as calculated according to ISO 9612:2009, was equal to 84 dB SPL.

The MER latency was measured with high time resolution (2 ms) by recording the DPOAE after acoustic stimulation. The latency was calculated between the time of the noise impulsion

and the start of decrease in DPOAE amplitudes. The measurements were repeated with different primaries. The contralateral stimulation intensities ranged from 110 dB to 125 dB. The mean latency required to trigger the MER was found to be 14 ms [range: 11 to 17 ms]. These results are in accordance with those reported by Berge et al. (1990) and Pilz et al. (1997). Both of them recorded the MER latency from cochlear microphonic potentials. As a result, a 15-s period between noise pulses was enough for the middle-ear muscles to relax. Each noise burst was therefore fully absorbed by the cochlea, with no attenuation due to the MER.

## 2.7. Histological analyses

At the end of the noise/CS<sub>2</sub> exposures, the cochleae of 25 rats were harvested for scanning electron microscopy (SEM) analyses of the organ of Corti. The other animals (n = 40) were returned to the animal facility for 10 weeks' recovery before the cochleogram analyses.

### 2.7.1. Scanning electron microscopy

Deep anesthesia was induced in rats with a mixture of ketamine/xylazine. Tissues were then fixed by intracardiac perfusion with 100 ml heparinized saline followed by 300 ml of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). The temporal bones were then removed, the tympanic bullae opened and the cochleae fixed once again by perilymphatic perfusion with 2.5% glutaraldehyde solution. Following primary fixation for 24 h, the cochleae were post-fixed with OsO<sub>4</sub> 1% in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h. After dehydration in graded ethanol concentrations from 25 to 70%, the cochleae were drilled to leave only a thin layer of cochlear bone.

The cochleae were then dissected to remove the bony capsule, the spiral ligament, the stria vascularis, the Reissner's, and tectorial membranes. The organ of Corti was dehydrated in ascending ethanol concentrations up to 100%. Samples were dried in a critical-point dryer using liquid CO<sub>2</sub> (Leica EM CPD300) and mounted on brass stubs using conductive silver paint prior to observation by SEM (Jeol 7400).

### 2.7.2. Cochleogram

Both the round and oval windows were opened to perfuse the cochleae with a succinate dehydrogenase (SDH) solution (0.05 M sodium succinate, 0.05 M phosphate buffer, and 0.05% tetranitro blue tetrazolium). Cochlea were then immersed in the solution for 1 h at 37 °C before fixing with 4% paraformaldehyde for 24 h. Cochleae were dissected under a binocular loupe to remove remaining bone and the lateral cochlear wall. The three turns of the organ of Corti were mounted in glycerin as a surface preparation to allow hair cells to be counted (cochleogram). The frequency-place map established by Müller (1991) was used to determine the positions of the frequency coordinates along the length of the organ of Corti. SDH staining density was plotted as a function of location along the basilar membrane. Hair cell loss was quantified by counting the number of cells present (blue spots) on the organ of Corti. A cochleogram showing the percentage hair cell loss as a function of distance/frequency was plotted for each animal. The results were averaged across each group of animals for comparison between groups.

## 2.8. Statistical analysis

A one way ANOVA was used to analyze the variations of in DPOAE amplitudes between exposed and control rats. The variations corresponded to  $\Delta = [\text{DPOAEs } 2 - \text{DPOAEs } 1] - K$ . The constant K was taken as the average of [DPOAEs 2–DPOAEs 1] calculated for the relevant control group.  $\Delta$  variations

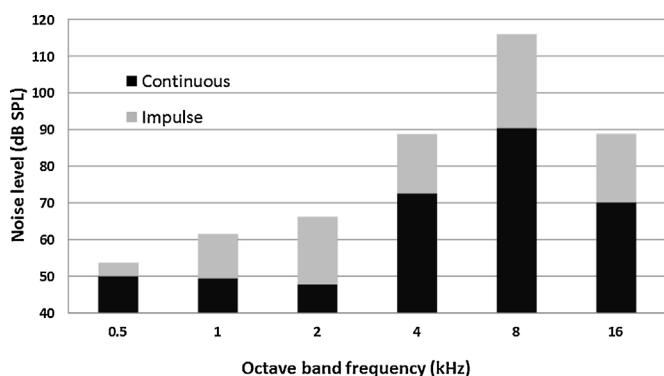


Fig. 2. Spectrum of octave band noises centered at 8 kHz. Black area: continuous noise; Gray area: impulse noise.



corresponded either the sum of the DPOAE variations at all frequencies or the DPOAE variation for one frequency. Statistical results are expressed as follows:  $F(\text{dfb}, \text{dfr}) = F\text{-ratio}$ ;  $p = p\text{ value}$ , in which  $\text{dfb}$  is the number of degrees of freedom between groups, and  $\text{dfr}$  is the number of residual degrees of freedom.

A multiple-range test was run to compare the  $\Delta$  variation between groups. This test was performed using the Bonferroni method expressed as follows: (contrast difference, with  $\pm$  limit).

Similarly, a one way ANOVA was used to analyze the percent hair cell loss between exposed and control rats.

The standard deviation (SD) is presented throughout the manuscript as an indicator of the variability of data distribution, and thus of the significance of the values. The statistical significance level was set to 5%.

### 3. Results

#### 3.1. General health

All rats ( $n = 78$ ) were in good health prior to inducing anesthesia to perform hearing tests. No significant differences in body weight were observed between exposed ( $n = 48$ ) and control groups ( $n = 30$ ) following exposure to noise and/or  $\text{CS}_2$ . Before starting exposure, the average body weight was almost identical for the control ( $225.7 \pm 18.1$  g), and exposed groups ( $226.6 \pm 9.2$  g). At the end of the exposure period, there were no significant differences in body weight between exposed animals ( $229.4 \pm 10.6$  g) and control animals ( $226.7 \pm 17.9$  g).

#### 3.2. Hearing tests

##### 3.2.1. Carbon disulfide exposure

None of the animals exposed to the nominal  $\text{CS}_2$  concentration of 250 ppm (actual  $[\text{CS}_2] = 228.8 \pm 16.4$  ppm) showed any significant variations in DPOAE amplitudes compared to the amplitudes measured in control animals for any of the couples of primaries tested.

##### 3.2.2. Exposure to continuous noise

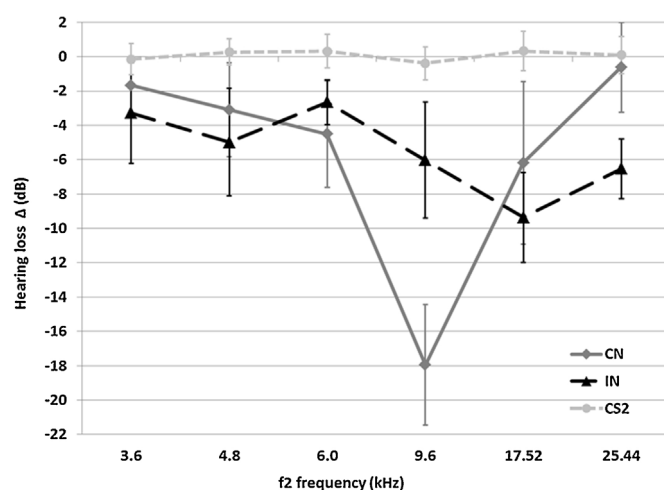
Exposure to continuous noise with a  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 89 dB SPL caused significant changes to the sum of DPOAE amplitudes [ $F_{\text{group}}^{[1,25]} = 50.2$ ;  $p < 0.001$ ]. One way ANOVAs indicated that the hearing loss differences between exposed ( $n = 8$ ) and control animals ( $n = 18$ ) were significant at all frequencies except at 25440 Hz. The maximum amplitude of approximately 18 dB was measured at 9600 Hz ( $p < 0.001$ ) (Mean<sub>control</sub> =  $0.2 \pm 0.53$  dB, Mean<sub>exposed</sub> =  $-17.95 \pm 1$  dB) (Fig. 3) which corresponds to a half-octave band above the exposure frequency (8kHzOBN).

##### 3.2.3. Exposure to continuous noise plus carbon disulfide

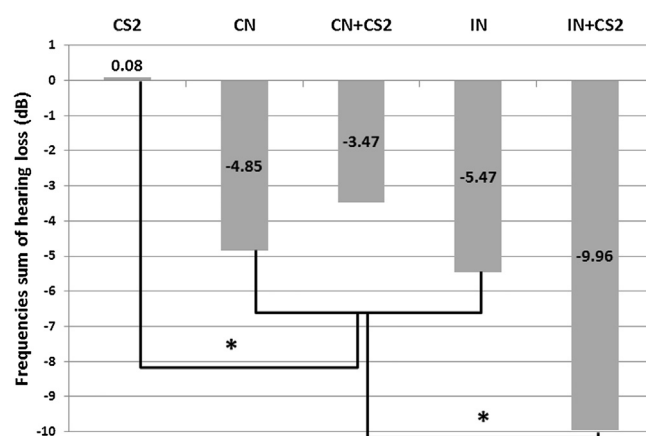
Combined exposure to continuous noise ( $L_{\text{EX},8\text{h}} = 89$  dB SPL) and to the nominal  $\text{CS}_2$  concentration of 250 ppm (actual  $[\text{CS}_2] = 242 \pm 15.9$  ppm) also affected the sum of DPOAE amplitudes [ $F_{\text{group}}^{[1,25]} = 53.28$ ;  $p < 0.001$ ]. Surprisingly, the hearing loss was lower than that measured for animals exposed to continuous noise alone. The differences between exposed ( $n = 8$ ) and control animals ( $n = 18$ ) were significant from 4800 Hz until 17520 Hz. As previously, the maximum amplitude was localized at 9600 Hz (Mean<sub>control</sub> =  $0.2 \pm 0.95$  dB, Mean<sub>exposed</sub> =  $-13.21 \pm 1.52$  dB) (data not shown). The overall effects of this combined exposure are reported and illustrated in Fig. 4.

##### 3.2.4. Exposure to impulse noise

The impulse noise with a  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 84 dB caused a significant hearing loss difference between exposed ( $n = 8$ ) and control rats ( $n = 18$ ) [ $F_{\text{group}}^{[1,25]} = 159.5$ ;  $p < 0.001$ ]. The amplitude of the



**Fig. 3.** Hearing loss  $\Delta$ :  $[(\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{exp}} - (\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{ctrl}}]$  as a function of the  $f_2$  primary for three experimental conditions. [1] CN: 6-h continuous noise with a  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 89 dB SPL ( $n = 8$ ), [2] IN: impulse noise with a  $L_{\text{EX},8\text{h}} = 84$  dB SPL ( $n = 8$ ), [3]  $\text{CS}_2$ : 250-ppm of  $\text{CS}_2$ , 15 min per hour for 6 h per day ( $n = 8$ ). Each curve indicates the difference in DPOAE amplitude obtained for each couple of frequencies tested. Values shown correspond to mean  $\pm$  SD.



**Fig. 4.** Comparison of the sum of the variations in DPOAE amplitude measured at the frequencies tested in the different experimental conditions.  $[(\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{exp}} - (\text{DPOAE2} - \text{DPOAE1})_{\text{ctrl}}]$  for the five experimental conditions. CN: continuous noise, IN: impulse noise,  $\text{CS}_2$ : carbon disulfide. Y-axis: sum at 3.6, 4.8, 6, 9.6, 17.5 and 25.4 kHz measured with a 60-dB primary intensity. \* =  $p < 0.05$ .

hearing loss was 9 dB at 17500 Hz, and more than 6 dB at 9600 and 25440 Hz (Fig. 3). The sum of amplitudes measured at the frequencies tested was quite similar to that obtained with the 6-h continuous noise alone (Fig. 4), even though the  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  was lower for the impulse noise than for the continuous noise. In this experiment, the variations measured at all the frequencies tested were clearly significantly different ( $p < 0.001$ ) between exposed and control animals; the most severe damage was measured at 17500 Hz ( $p < 0.001$ ) (Mean<sub>control</sub> =  $0.05 \pm 0.56$  dB, Mean<sub>exposed</sub> =  $-9.35 \pm 0.83$  dB).

##### 3.2.5. Exposure to impulse noise plus 250-ppm carbon disulfide

Co-exposure to the nominal  $\text{CS}_2$  concentration of 250 ppm (actual  $[\text{CS}_2] = 234.9 \pm 19.1$  ppm) associated with the impulse noise potentiated the traumatic impact of the noise [ $F_{\text{group}}^{[1,25]} = 183.7$ ;  $p < 0.001$ ]. One way ANOVAs tests indicated that the hearing loss differences between exposed ( $n = 8$ ) and control animals ( $n = 18$ ) were statistically significant ( $p < 0.001$ ) at all frequencies (data not shown). As impulse noise alone, the maximum amplitude was



localized at 17500 Hz ( $\text{Mean}_{\text{control}} = 0.05 \pm 0.85 \text{ dB}$ ,  $\text{Mean}_{\text{exposed}} = -16.9 \pm 1.27 \text{ dB}$ ). The overall effects of this combined exposure are reported and illustrated in Fig. 4.

**3.2.5.1. Comparison between the different experimental conditions.** Multiple-range test indicated that there were no significant differences between the extent of hearing loss obtained between continuous noise ( $-4.85 \pm 2.6 \text{ dB}$ ) vs. impulse noise ( $-5.47 \pm 1.2 \text{ dB}$ ) (Fig. 4). This result was to be expected as the  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of the noises were initially chosen to induce similar levels of hearing loss between the two groups of animals following exposure to noise alone.

Also as expected, exposure to  $\text{CS}_2$  did not provoke any significant variation in DPOAE amplitudes ( $0.08 \pm 0.4 \text{ dB}$ ). Therefore, a large difference was measured between the carbon disulfide group and the other groups of exposed animals (Fig. 4).

In addition, there was a large difference between the DPOAE amplitudes obtained with the impulse noise plus 250-ppm  $\text{CS}_2$  and the other groups. The combination of exposure to  $\text{CS}_2$  and the impulse noise significantly increased the differences in DPOAE amplitude ( $-9.96 \pm 2.2 \text{ dB}$ ) relative to those measured with the impulse noise alone (contrast difference = 4.49, with limit  $\pm 2.59$ ). Finally, although there was no significant difference between continuous noise and continuous noise plus  $\text{CS}_2$ , the data shown in Fig. 4 indicate a decrease in the amplitude. Thus, the continuous noise plus  $\text{CS}_2$  group ( $-4.85 \pm 1.5 \text{ dB}$ ) showed a less extensive variation in amplitude than the group exposed to continuous noise alone.

### 3.3. Histological analyses

#### 3.3.1. Cochleogram (10 weeks after exposure)

**3.3.1.1. Continuous noise alone or in combination with  $\text{CS}_2$ .** The average cochleogram obtained from 5 rats exposed to continuous noise plus  $\text{CS}_2$  is shown in Fig. 5. Similar cochleograms were obtained for the group of animals exposed to continuous noise alone and the control group (data not shown). For these three groups, loss of inner hair cells and hair cells on the first outer row

never exceeded 1%. However, losses of 1 and 3% were measured in the second and third rows of outer hair cells in the animals exposed to continuous noise or to continuous noise and solvent. Although the hearing loss induced by the 6-h continuous noise was significant, there was not visible cell loss on the cochleograms. The absences of outer hair cells (OHC) at high frequencies (over 50 kHz) reported in the cochleogram were due to the morphology of the organ of Corti in the region dedicated to the highest frequency discrimination. The organ of Corti is so straight at the extremity that only the inner hair cells are present, then appears the first, the second and finally the third row of outer hair cells.

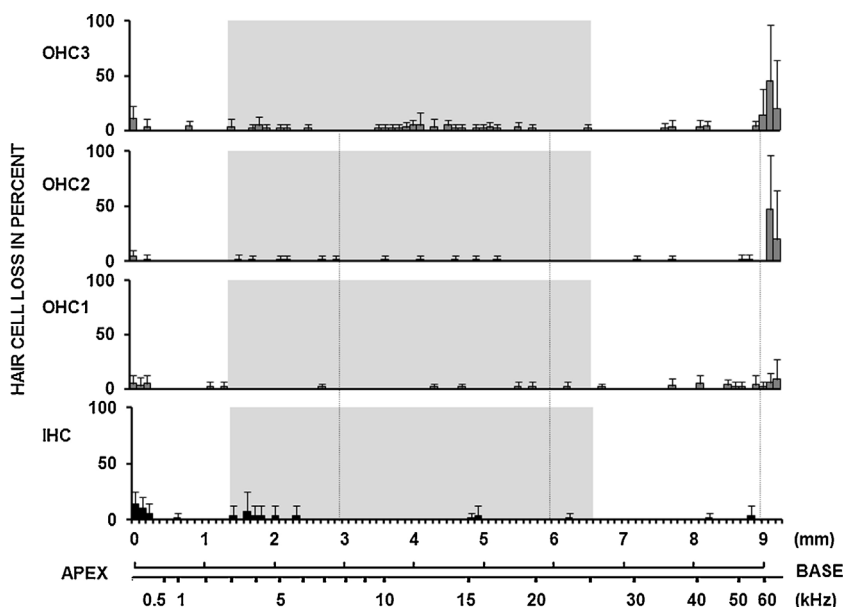
**3.3.1.2. Impulse noise plus  $\text{CS}_2$  and impulse noise alone.** The average cochleogram obtained for 5 rats exposed to impulse noise alone was similar to that obtained with controls ( $n=5$ ). Like the continuous noise, the impulse noise did not visibly alter the cochleogram. However, the combination of  $\text{CS}_2$  with the impulse noise provoked significant loss of outer cells at the level of OHC3 [ $F_{\text{group}}^{[1,9]} = 26.71$ ;  $p < 0.001$ ] and OHC2 [ $F_{\text{group}}^{[1,9]} = 22.39$ ;  $p = 0.0015$ ], as illustrated in Fig. 6.

In these experimental conditions, a large proportion (28%) of outer hair cell loss at OHC3 was located in the region corresponding to frequencies ranging from 8 to 13 kHz.

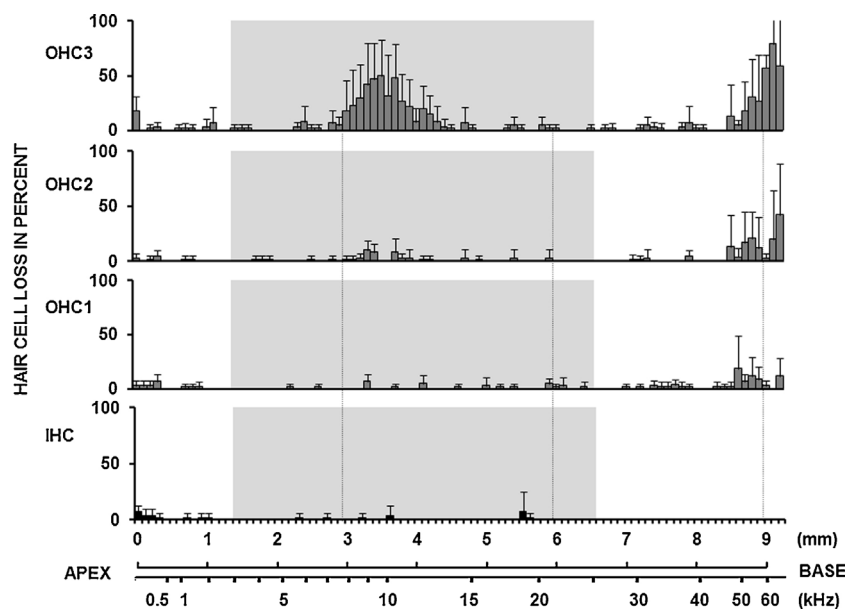
**3.3.1.3. 250-ppm carbon disulfide.** The average cochleogram obtained for 5 rats exposed to  $\text{CS}_2$  alone was similar to that obtained with control animals ( $n=5$ ). For these reasons, the cochleogram obtained with  $\text{CS}_2$ -exposed rats is not shown here. The cochleogram was very similar to that obtained for animals exposed to continuous noise plus  $\text{CS}_2$  (Fig. 5).

#### 3.3.2. Scanning electron microscopy (at the end of exposure)

Exposure to continuous noise alone ( $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 89 dB, 6 h/d, 5 d) or to continuous noise plus solvent (250 ppm, 6 h) did not cause any obvious injury to stereociliae. Most of the time, samples from these animals resembled samples from controls (Fig. 7A and B). When present, injuries were subtle and difficult to evaluate with regard to controls. In contrast, in rats exposed to impulse noise ( $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 89 dB, 6 h/d, 5 d) broken stereociliae were observed, some



**Fig. 5.** Average cochleogram ( $n=5/\text{group}$ ) at the end of exposure from sedentary Long Evans rats exposed to 6-h continuous noise [ $L_{\text{EX},8\text{h}} = 89 \text{ dB SPL}$ ] plus 250-ppm  $\text{CS}_2$ . Exposure schedule: 6 h/d, 5 d/w, 1 w. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 second row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.



**Fig. 6.** Average cochleogram ( $n = 5/\text{group}$ ) at the end of exposure from sedentary Long Evans rats exposed to impulse noise [ $L_{EX,8h} = 84 \text{ dB SPL}$ ] plus 250-ppm  $\text{CS}_2$ . Exposure schedule: 6 h/d, 5 d/w, 1 w. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 s row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

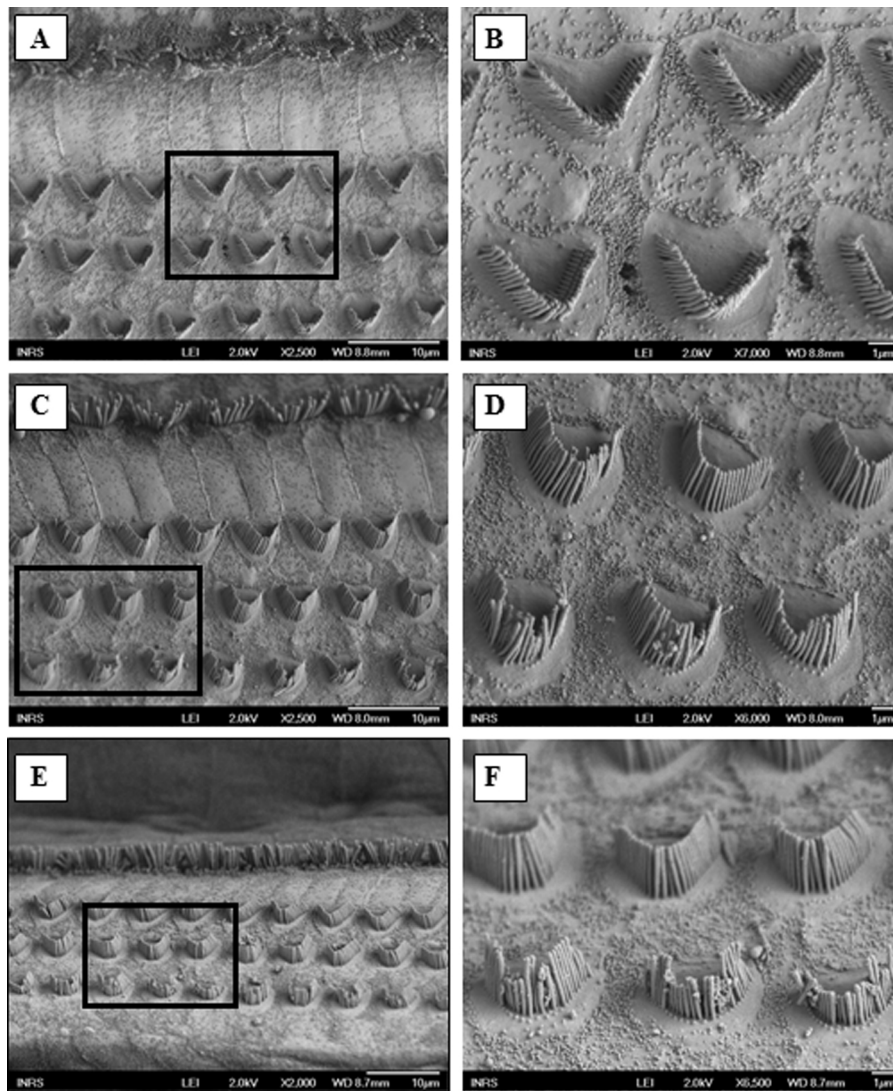
of them were even uprooted from the cuticular plates at the level of the third row of OHC (Fig. 7E and F). Injured stereociliae were observed in the regions corresponding to the most damaged frequencies, in a tonotopic area ranging from approximately 4 to 20 kHz. Similar observations were made in the group exposed to impulse noise plus  $\text{CS}_2$ ; in samples from these animals, damaged stereociliae were observed at the level of the third row of outer hair cells (Fig. 7C and D).

#### 4. Discussion

The primary findings of this study are that impulse noises are more damaging to hearing than continuous noises. The data presented here confirm results obtained in previous studies by our research group (Lataye and Campo, 1996; Campo et al., 2014; Venet et al., 2015) and by other teams (Henderson and Hamernik, 1986), demonstrating that the effects of impulse noise do not fit the equal energy hypothesis. Indeed, when we compared the cochlear effects of a continuous noise ( $L_{EX,8h} = 89 \text{ dB SPL}$ ) with those obtained with an impulse noise ( $L_{EX,8h} = 84 \text{ dB SPL}$ ) with the same spectrum (8kHzOBN), the latter induced more harmful effects in the cochlea than the continuous noise although the 5 dB difference between both  $L_{EX,8h}$ . These effects are best illustrated by the histological data. Thus, stereociliae in the third row of outer hair cells are clearly damaged after exposure to impulse noise, compared to those exposed to a continuous noise. Broken and ripped stereociliae were observed only on organs of Corti exposed to impulse noises (Fig. 7C, D), even though the  $L_{EX,8h}$  was moderate and the exposure period (one week) was relatively short. Based on these results, the equal energy principle is obviously inappropriate for use in designing preventive measures as it fails to effectively prevent damage/risk to workers' hearing due to impulse noises. Because of these results, we strongly believe that the temporal structure (continuous vs. impulse) of noises should be taken into consideration when developing hearing conservation programs in the USA and Europe. In the experiments described in this paper, the maximum intensity (peak level) reached with the impulse noise exposure was 128 dB SPL. This level is considerably lower than the noise exposure limits defined either in the USA or Europe. Given

the traumatic effects observed with this level of impulse noise, it seems clear that the current recommended noise limits are still too high. Beyond the intensity, the temporal structure of the noise can affect the efficiency of natural protective mechanisms such as the MER. Although the impact of a 6-h continuous noise can be quite well attenuated by the MER, the impact of impulse noise cannot (Dunn et al., 1991; Lataye and Campo, 1996). Indeed, the acoustic energy of this type of noise is dissipated into the cochlea before the MER can be triggered (Borg et al., 1984; Stevin, 1986). Thus, the MER appears to be a key phenomenon in terms of prevention as it considerably reduces the acoustic energy absorbed by the inner ear.

However, exposure to solvents can modify the function of the MER, and therefore the impact of combined exposure to solvent plus noise may differ from exposure to noise alone (Wathier et al., 2016). In the series of experiments presented here, we tested the effects of a highly lipophilic solvent,  $\text{CS}_2$ , which is known to be neurotoxic (Clerici and Fechter, 1991). The primary neural lesion produced by  $\text{CS}_2$  exposure is central-peripheral distal axonopathy (Pappolla et al., 1987). In the experiments performed here, no cochleotoxic effect was observed after  $\text{CS}_2$  exposure and the cochleogram for the  $\text{CS}_2$  group was similar to that for the control group. We also observed that the outer hair cells functioned correctly following exposure to  $\text{CS}_2$  since the DPOAE amplitudes were the same as prior to exposure (Fig. 4). Although  $\text{CS}_2$  did not show a cochleotoxic effect in the conditions applied in this study, it could modify the MER function. Indeed comparison of the results obtained after exposure to the continuous and impulse noises reflected the same phenomenon as previously reported with aromatic solvents, such as styrene, when associated with noise (Venet et al., 2015). In the current study, the results show that the protective effect brought by the  $\text{CS}_2$  is more weak than that measured in the styrene study, but the experimental conditions were also different. The  $\text{CS}_2$  and styrene exposures lasted 1 week and 4 weeks respectively, moreover the noise intensity was 5 dB higher in the current experiment. Such differences can easily explain the difference of significance between the two experiments. Nevertheless the trend is obvious. Depending on the nature of the noise, the MER can make a drastic difference in terms of the



**Fig. 7.** Scanning electron micrographs of organs of Corti 10 weeks after exposure from Long Evans rats.

*Upper panel.* Control rats: (A) Low power view (X 2500) showing the organization of stereocilia making up the outer hair cells (OHC) and inner hair cells (IHC); (B) (X 7000) The W shape of the stereocilia can be observed at approximately 9 kHz.

*Central panel.* Rats exposed to an impulse noise ( $L_{EX,8h}$  of 84 dB) for 1 week. (C) (X 2500) and (D) (X 6000) show typical injury to stereocilia at the level of OHC3. Tonotopic area: approximately 8 kHz.

*Lower panel.* Rat exposed to impulse noise plus CS<sub>2</sub> for 1 week. (E) (X 2000) and (F) (X 6500) show injuries to stereocilia at the level of OHC3. Tonotopic area: approximately 9 kHz.

traumatic effects on the cochlea (Campo et al., 2014). We obtained a synergistic cochlear effect with the following combination: CS<sub>2</sub> plus impulse noise, and, as expected and described in Campo et al. (2014), a tendency to reduction in cochlear injury with the combination CS<sub>2</sub> plus continuous noise. As for styrene (an aromatic solvent), CS<sub>2</sub> can have a rapid pharmacological impact on the central nervous system (CNS), decreasing the threshold beyond which the MER is triggered. This effect could be due to a change in polarization at the level of the plasma membrane (Magnusson et al., 1998), which could modify the threshold of the MER trigger. Indeed, toluene (another aromatic solvent) has been shown to modify the voltage-dependant functioning of Ca<sup>2+</sup> channels involved in the MER (Maguin et al., 2009). These types of modifications could be the reason behind why the MER threshold was decreased in the presence of aromatic solvents, or CS<sub>2</sub>, and may explain why co-exposure to noise and solvents alters the impact of continuous noises on subjects' hearing. Given the duration of exposure and the moderate intensity of the continuous noise used in the current investigation, CS<sub>2</sub> appears to decrease the

MER trigger threshold (consequently it would increase the MER amplitude) by neuropharmacological effects. This would in turn reduce the cochleotraumatic effect of the continuous noise. In stark contrast, co-exposure to impulse noise and CS<sub>2</sub> increased the vulnerability of the organ of Corti, probably due to inefficient triggering of the MER. This clearly illustrates the risk of potentiating NIHL when exposures to impulse noise and CS<sub>2</sub> are combined. This effect is shown by the loss of outer hair cells at the level of the third row, corresponding to frequencies ranging from 8 to 13 kHz which corresponds to half an octave above the central frequency of the noise exposure spectrum. The solvent-induced hearing loss is not located at specific frequencies. As shown in Venet et al. (2015), the damage due to solvents is rather restrained to noise-stimulated cells (half an octave above the central frequency of the noise spectrum). Damage to the stereocilia was observed at the end of the exposure period. Ten weeks post-exposure, co-exposure to impulse noise plus CS<sub>2</sub> triggered or speeded up the cell elimination process (Fig. 6). In contrast, the impulse noise alone broke the stereociliae, without inducing a cell

loss after a 10-week recovery period. Whatever the nature of the synergistic phenomenon, the results obtained in this study indicated that a moderate concentration of CS<sub>2</sub> potentiates the cochlear damage caused by impulse noise, whereas it reduces the cochlear damage caused by continuous noise. The explanation for this paradox is probably that CS<sub>2</sub>, like styrene, has a rapid pharmacological impact on the CNS which modifies the efficiency of the MER. Whatever the physiological explanation, it should be remembered that impulse noises are more damaging to hearing than continuous noises, and that their traumatic effects can be potentiated by CS<sub>2</sub>.

## 5. Conclusions

Depending on the nature of noises (impulse vs. continuous), various levels of traumatic effects can be induced in cochleae. Impulse noises are clearly more damaging than continuous noises, when all other acoustic parameters are equivalent (spectrum and energy). This difference in effects is even more obvious when noise and solvent exposure are combined. Carbon disulfide has two different impacts: it can modify the MER and it can potentiate the severity of impulse noise effects. The stereociliae of the outer hair cells in the third row are the most vulnerable cellular structures within the organ of Corti, they are particularly sensitive to co-exposure to impulse noise plus solvent. Based on results obtained both with CS<sub>2</sub> (non-aromatic solvent) and styrene (aromatic solvent), it is clear that the nature of the noise and any co-exposure to solvents should be integrated into hearing conservation programs devised to help protect workers' audition. A 5-dB decrease in action values [80 dB (A) vs. 85 dB (A)] and in peak values [a recommendation at 125 vs. 130 dB (C) and a required protection from 130 dB (C) instead of 135 dB (C)] in case of co-exposure would be a quick and (hopefully) efficient solution.

## Funding

This work was entirely supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France).

## Conflict of interest statement

The authors indicate that they have no actual or potential conflict of interest to declare, including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceived to influence, the results as presented in this work.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Joseph Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with rat handling and husbandry.

## References

- Berge, H., Kingma, H., Kluge, C., Marres, E.H., 1990. Electrophysiological aspects of the middle ear muscle reflex in the rat: latency, rise time and effect on sound transmission. *Hear. Res.* 48 (3), 209–219.
- Borg, E., Counter, S., Röster, G., 1984. Theories of middle-ear muscle functions Silman Shlomo, The Acoustic Reflex: Basic Principles and Clinical and Applications. , pp. 77–79.
- Campo, P., Maguin, K., Lataye, R., 2007. Effects of aromatic solvents on acoustic reflexes mediated by central auditory pathways. *Toxicol. Sci.* 99, 582–590.
- Campo, P., Morata, T., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis. Mon.* 59 (4), 119–138.
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Chantal, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene: consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120.
- Chang, S.J., Shih, T.S., Chou, T.C., Chen, C.J., Chang, H.Y., Sung, F.C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Med.* 111, 1620–1624.
- Chen, G.D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33.
- Clerici, W., Fechter, L., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255.
- Directive 2003/10/EC, 2003. On the minimum health and safety requirements regarding the exposure of workers to the risks arising from physical agents (noise). *Off. J. Eur. Communities* L042, 38–44.
- Directive 2010/63/EC, 2010. Protection of animals used for scientific purposes. *Official journal of the European Communities* L 276/33.
- Dunn, D., Davis, R., Merry, C., Franks, R., 1991. Hearing loss in chinchilla from impact and continuous noise exposure. *J. Acoust. Soc. Am.* 90, 1979–1985.
- Hamernik, R., Patterson, J., Turrentine, G., Ahroon, W.A., 1989. The quantitative relation between sensory cell loss and hearing thresholds. *Hear. Res.* 38, 199–212.
- Henderson, D., Hamernik, R., 1986. Impulse noise: critical review. *J. Acoust. Soc. Am.* 80 (2), 569–584.
- Henley, C.M., Owings, M.H., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1990. Postnatal development of 2f1-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* 43, 141–148.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8 (32), 114–133.
- ISO 9612:2009 Acoustics – Determination of occupational noise exposure – Engineering method (ISO 9612:2009)
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., 2017. Noise-induced cochlear synaptopathy: past findings and future studies. *Hear. Res.*
- Lataye, R., Campo, P., 1996. Applicability of the Leq as a damage-risk criterion: an animal experiment. *J. Acoust. Soc. Am.* 99, 1621–1631.
- Liberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear. Res.*
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.
- Magnusson, A., Sulaiman, M., Dutia, M., Tham, R., 1998. Effects of toluene on tonic firing and membrane properties of rat medial vestibular nucleus neurones in vitro. *Brain Res.* 779, 334–337.
- Maguin, K., Campo, P., Parietti-Winkler, C., 2009. Toluene can perturb the neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels involved in the middle-ear reflex. *Toxicol. Sci.* 107, 473–481.
- Morata, T., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol.* 34 (6), 995–1004.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H., Miller, C., Sahenk, H., Autilio-Gambetti, Z., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy: another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pilz, P.K., Ostwald, J., Kreiter, A., Schnitzler, H.U., 1997. Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear. Res.* 105 (1–2), 171–182.
- Shaffer, L.A., Withnell, R.H., Dhar, S., Lilly, D.J., Goodman, S.S., Harmon, K.M., 2003. Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear Hear.* 24 (5), 367–379.
- Stevin, G., 1986. Simulation of the middle ear acoustic reflex applied to damage-risk for hearing produced by burst fire. *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*, vol. 111. , pp. 271–280 NATO ASI Series.
- Venet, T., Rumeau, C., Campo, P., Thomas, A., Chantal, C., 2011. Neuronal circuits involved in the middle-ear acoustic reflex. *Tox. Sci.* 119, 146–155.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Chantal, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63.
- Wathier, L., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., Campo, P., Gansmüller, A., 2016. Membrane fluidity does not explain how solvents act on the middle-ear reflex. *Neurotoxicology* 57, 13–21.
- Zheng, G., Hu, B.H., 2012. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea. *BMC Neurosci.* 13, 71.







## Full Length Article

# Continuous exposure to low-frequency noise and carbon disulfide: Combined effects on hearing



Thomas Venet<sup>a,\*</sup>, Maria Carreres-Pons<sup>a,c</sup>, Monique Chalansonnet<sup>a</sup>, Aurélie Thomas<sup>a</sup>, Lise Merlen<sup>a</sup>, Hervé Nunge<sup>a</sup>, Elodie Bonfanti<sup>a</sup>, Frédéric Cosnier<sup>a</sup>, Jordi Llorens<sup>c,d</sup>, Pierre Campo<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519, Vandœuvre Cedex, France

<sup>b</sup> DevAH EA 3450 – Développement, Adaptation et Handicap, Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine, F-54500 Vandœuvre, France

<sup>c</sup> Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 May 2017

Received in revised form 22 June 2017

Accepted 22 June 2017

Available online 24 June 2017

## Key-words:

Carbon disulfide

Low-frequency noise

Combined exposure

Rat

Hearing

Dose effect

## ABSTRACT

Carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) is used in industry; it has been shown to have neurotoxic effects, causing central and distal axonopathies. However, it is not considered cochleotoxic as it does not affect hair cells in the organ of Corti, and the only auditory effects reported in the literature were confined to the low-frequency region. No reports on the effects of combined exposure to low-frequency noise and CS<sub>2</sub> have been published to date. This article focuses on the effects on rat hearing of combined exposure to noise with increasing concentrations of CS<sub>2</sub> (0, 63, 250, and 500 ppm, 6 h per day, 5 days per week, for 4 weeks). The noise used was a low-frequency noise ranging from 0.5 to 2 kHz at an intensity of 106 dB SPL. Auditory function was tested using distortion product oto-acoustic emissions, which mainly reflects the cochlear performances. Exposure to noise alone caused an auditory deficit in a frequency area ranging from 3.6 to 6 kHz. The damaged area was approximately one octave (6 kHz) above the highest frequency of the exposure noise (2.8 kHz); it was a little wider than expected based on the noise spectrum. Consequently, since maximum hearing sensitivity is located around 8 kHz in rats, low-frequency noise exposure can affect the cochlear regions detecting mid-range frequencies. Co-exposure to CS<sub>2</sub> (250-ppm and over) and noise increased the extent of the damaged frequency window since a significant auditory deficit was measured at 9.6 kHz in these conditions. Moreover, the significance at 9.6 kHz increased with the solvent concentrations. Histological data showed that neither hair cells nor ganglion cells were damaged by CS<sub>2</sub>. This discrepancy between functional and histological data is discussed. Like most aromatic solvents, carbon disulfide should be considered as a key parameter in hearing conservation regulations.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Noise exposure is known to cause hearing loss, and the main contributor to occupational hearing loss is exposure to high-intensity noise in the working environment. The permissible threshold limit values for occupational noise in Europe and the United States are 87 dB(A) and 90 dB(A), respectively. The types of injury incurred by the auditory receptor are numerous. For instance, high-intensity noise or impulse noises can damage the stereociliae of hair cells (Carreres Pons et al., 2017; Liberman and

Dodds, 1987; Wang et al., 2002); noise can provoke hair cell loss and even collapse of Hensen cells (Campo et al., 2014; Kurabi et al., 2016; Wang et al., 2002); some authors have reported possible Reissner membrane disruptions (Wang et al., 2002); and recently, synaptopathies and swelling underneath the hair cells were linked to temporary and permanent hearing loss (Kobel et al., 2016; Liberman and Kujawa, 2017; Moser et al., 2013; Wang et al., 2002).

Hearing loss induced by low-frequency noises differs from that caused by mid- or high-frequency noises. For instance, hearing deficits caused by low-frequency noise cover a wider frequency window than those induced by mid- and high-frequency noises (Burdick, 1982). Thus, low-frequency noises first cause damage in the cochlear region where low-frequencies are discriminated (apex), then sweep down toward the mid- and high-frequency

\* Corresponding author.

E-mail address: [thomas.venet@inrs.fr](mailto:thomas.venet@inrs.fr) (T. Venet).

### Acronyms

AS	Amplitude Shift of DPOAE levels at the end of exposure
CNS	Central Nervous System
CS <sub>2</sub>	Carbon Disulfide
dB SPL	Decibel Sound Pressure Level
dB(A)	Decibel weighted A
DPOAEs	Distortion Product Oto-Acoustic Emissions
IHC	Immunohistochemistry
LEX,8h	Equivalent continuous noise level calculated over 8 h
LM	Light microscopy
OHC	Outer Hair Cells
PAS	Permanent Amplitude Shift of DPOAE levels 4 weeks after exposure
PBS	Phosphate Buffer Saline
SDH	Succinate DeHydrogenase
SEM	Scanning electronic microscopy
TTCA	2-Thio-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid
TWA	Time Weighted Average. Average exposure within the workplace using the baseline of an 8-hour day or 40-hour week work schedule

regions (base) (Bohne and Harding, 2000). However, the nature of the damage caused by this type of noise is not well described in the literature.

Carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) is a volatile, inflammable solvent which is widely used in the production of viscose rayon fibers and cellophane films (Rolecki and Tarkowski, 2000). In industrial viscose production, daily exposures of around 40 ppm have been reported in the literature (Göen et al., 2014; Vanhoorne et al., 1995). These exposure levels are well above the threshold limit values (TWA) authorized in Europe (5 ppm) and the United States, where the OSHA recommends 20 ppm. Currently, based on numerous epidemiological studies, experts recommend even lower limit values, ranging between 1 and 10 ppm (Beauchamp et al., 1983; Newhook and Meek, 2002).

The most common toxic effects of CS<sub>2</sub> reported in the literature are neurofilamentous axonopathies (Llorens, 2013), which can affect both sensory and motor neurons (Hirata et al., 1996; Johnson et al., 1983; Takebayashi et al., 1998). Vascular complications have also been reported (Kotseva et al., 2001; Partanen et al., 1970; Sulsky et al., 2002). In rats, an abnormal accumulation of neurofilaments in the long axons of the peripheral and central

nervous systems has been observed (Clerici and Fechter, 1991; Gottfried et al., 1985; Knobloch et al., 1979; Pappolla et al., 1987). Rebert and Becker, 1986, and Hirata et al., 1992, demonstrated CS<sub>2</sub>-induced axonopathies in peripheral and central auditory fibers in rats. In occupational environments, CS<sub>2</sub> exposure is most frequently associated with co-exposure to noise, and significant hearing loss is often found in co-exposed workers. According to Chang et al., 2003, Morata, 1989, hearing loss is more frequent and severe in cases of co-exposure than with exposure to noise alone. Similar effects have been observed with other aromatic solvents, and experimental studies in rats clearly demonstrated synergistic effects on hearing of co-exposure to noise (Campo et al., 2013; Chen and Henderson, 2009; Pouyatos et al., 2005; Venet et al., 2015). Very few studies have been performed to date in humans (Chang et al., 2003; Morata, 1989) combining exposure to noise and CS<sub>2</sub>, and no histological analyses have been performed in rats.

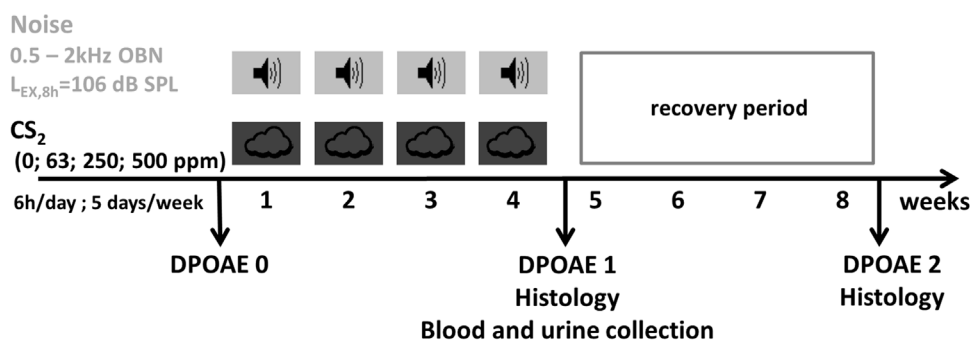
For these reasons, the main purpose of the current investigation was to analyze how co-exposure to a low-frequency noise and a range of CS<sub>2</sub> concentrations affected hearing in rats. The impact of the exposure scenario on hearing was assessed using distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) which reflect outer hair cell (OHC) motility (Avan et al., 2001). OHC are innervated by afferent nerve fibers (10%) and efferent nerve fibers (90%) which control their mechanical activity and determine frequency discrimination (Dannhof and Bruns, 1993). Functional investigations were complemented by a morphological analysis of the cochlea. In addition, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) was assayed in rat urine as it is known to be the best urinary metabolic indicator of CS<sub>2</sub> exposure in both humans (Riihimäki et al., 1992) and rats (Cox et al., 1996). Circulating CS<sub>2</sub> levels were also determined in blood.

The results obtained are discussed with regard to current occupational threshold limits which are supposed to regulate the risks encountered by all workers, including co-exposed workers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The animal facilities where experiments were performed are fully accredited by the French Ministry of Agriculture (authorization No. D 54–547–10). While conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European Parliament and of the Council (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010). The study, referenced as APAFIS#3950-201602051 1372481, was approved by the ethics committee at the Ministry of Education and Research. Adult female Long Evans rats (n = 117) weighing approximately 250 g



**Fig. 1.** Experimental protocol. Exposure to carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) and noise lasted 6 h/day, 5 days/week, for 4 weeks. The  $L_{EX,8h}$  for the noise was 105 dB SPL and the spectrum was an octave band noise (OBN) ranging from 0.5 to 2 kHz. The CS<sub>2</sub> concentration was 0, 63, 250 or 500 ppm. Hearing was tested using cubic distortion product oto-acoustic emissions (DPOAEs) prior to exposure (DPOAE0), at the end of exposure (DPOAE1), and 4 weeks after exposure (DPOAE2). Blood and urine samples were collected at the end of the exposure period. Histological analyses were performed at the end of the exposure period and 4 weeks post-exposure.

were used in all experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, 53941, France). Rats were 8-weeks-old when they arrived at the animal facility, and they were acclimatized for 10 weeks before starting experiments. Thus, all animals were 18-weeks-old at the start of experiments. Animals were housed two per cage (1032 cm<sup>2</sup> × 20 cm height) on irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). A 12:12 h light: dark cycle (07:30–19:30) was maintained in the facility, room temperature was 22 ± 2 °C, and relative humidity 55 ± 10%. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure. The background noise level in the animal facilities was around 43.5 dB (A). Animals were weighed weekly and overall toxicity was assessed.

## 2.2. Protocol

An overall picture of the experimental design is shown in Fig. 1.

Animals were exposed to a low-frequency continuous noise with or without concomitant exposure to CS<sub>2</sub>. The noise spectrum ranged from 0.5 to 2 kHz, with an equivalent daily noise exposure (L<sub>EX,8h</sub>) of 105 dB SPL. Animals were distributed among four exposure groups coupled with four control groups (Table 1). Each exposed group was simultaneously exposed to noise and CS<sub>2</sub> at 0, 63, 250 or 500 ppm. Exposure lasted for 6 h per day, 5 consecutive days per week over a total of 4 weeks.

Rats' hearing was tested using cubic DPOAEs prior to exposure (DPOAE0), at the end of the exposure period (DPOAE1), and 4 weeks post-exposure (DPOAE2). Blood samples were collected from eight rats in each CS<sub>2</sub>-exposed group and from 18 control animals at the end of the exposure period to analyze the circulating CS<sub>2</sub> concentration. Urine samples were also collected to analyze TTCA concentrations. Following exposure, 31 animals were sacrificed to perform light microscopy analysis (LM) and immunohistochemistry (IHC) (Table 1). The other 86 animals were allowed to recover for 4 weeks in the animal facility. At the end of the experiment, the cochleae were harvested from all animals to perform morphological observations: LM, IHC, cochleogram based on succinate dehydrogenase labeling (SDH), and scanning electron microscopy (SEM) (Table 1).

## 2.3. Anesthesia

Light general anesthesia was required to record DPOAEs in rats. Animals were anesthetized by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was continuously monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C.

For blood collection, rats were anesthetized with 5% isoflurane gas and maintained with 3% isoflurane. The gas was administered

through a vaporizer (Isotec 4, Ohmeda), fed by a generator (O2 Millennium 5 Concentrator, Respironics).

For tissue collection, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (75/5 mg/kg) (i.p.) before decapitation.

## 2.4. Hearing testing

Hearing was tested by measuring DPOAEs. Before recording DPOAEs, an otoscopic examination was performed to verify that the external ear canal was not obstructed by wax and that there was no infection in the middle-ear. The device and methodology used to record DPOAEs are described in detail in Carreres Pons et al., 2017. Briefly, six pairs of primary tones (f1–f2) were delivered to the left ear: (3–3.6), (4–4.8), (5–6), (8–9.6), (14.6–17.5), and (21.2–25.4) kHz. The f1 to f2 ratio for these primaries was always 1.2 (Henley et al., 1990), and the level difference (L1–L2) was equal to 14 dB. To simplify the presentation of results hereafter, each pair of primaries will be indicated only by the f2.

Hearing was tested just prior to exposure (DPOAE0), at the end of exposure (DPOAE1) and 4 weeks after exposure (DPOAE2). The amplitude shift (AS) measured at the end of exposure was calculated based on the difference between measurements (DPOAE1–DPOAE0). The Permanent Amplitude Shift (PAS) was calculated by determining the difference between DPOAE2 and DPOAE0 measurements.

## 2.5. Carbon disulfide exposure

During exposure, all rats (controls, noise, CS<sub>2</sub>- or noise + CS<sub>2</sub>-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain a dynamic, adjustable airflow (5–6 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H<sub>2</sub>O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22 ± 1 °C and relative humidity of 55 ± 10%.

CS<sub>2</sub> was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface of the glass streamer. The vapor was carried forward with an additional airflow through the streamer, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 63, 250 or 500 ppm CS<sub>2</sub>, 6 h per day for 5 consecutive days over 4 weeks. Control animals (n=52) were always ventilated with fresh air.

The exposure levels were determined from samples of the chamber's atmosphere collected using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS<sub>2</sub> was desorbed from the adsorbent with methylene chloride (DCM). Methyl-ethyl-ketone (MEK) was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu). CS<sub>2</sub> samples were assayed on a 30 m × 0.25 mm (1 μm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard) (Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/s. The column temperature program was: 40 °C for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 μL) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. The temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The MS was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode, tracking ions 43 (for IS) and 76 (for CS<sub>2</sub>). These analyses allowed daily calibrations to be performed. During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously follow the stability of vapor generation throughout the exposure period.

**Table 1**

Number of control and exposed animals used in each experiment. CS<sub>2</sub>: carbon disulfide. LF: low-frequency noise. DPOAE: cubic distortion product oto-acoustic emissions. LM: light microscopy. IHC: immunohistochemistry. SEM: scanning electron microscopy. SDH: cochleogram based on succinate dehydrogenase labeling. T0: before exposure. T1: at the end of exposure. T2: 4 weeks after exposure.

	Total	DPOAE T0 T1 T2	LM T1	IHC T1	LM T2	IHC T2	SEM T2	SDH T2
<b>LF + 0 ppm CS<sub>2</sub></b>	30	12	5	4	6	4	4	7
<b>LF + 63 ppm CS<sub>2</sub></b>	8	8	/	/	4	/	/	4
<b>LF + 250 ppm CS<sub>2</sub></b>	20	11	4	4	3	3	2	4
<b>LF + 500 ppm CS<sub>2</sub></b>	7	7	/	/	3	/	/	4
<b>Control</b>	52	30	6	8	14	7	4	13



## 2.6. Noise exposure

One loudspeaker with two drivers was positioned in the ceiling of the chambers. The continuous noise lasted for 6 h at 106 dB SPL ( $L_{Ex,8h} = 105$  dB). The spectrum was a pink noise filtered on three octave bands ranging from 0.5 to 2 kHz, which corresponds to the lowest hearing sensitivity in rats. Animals were individually placed in compartmentalized cages to avoid any acoustic screens due to inter-individual interaction. As a result, the acoustic field was homogenous inside the chamber ( $\pm 1$  dB between the different cells of the cage). Moreover, the animals were positioned according to a daily rotating scheme to minimize between-subject differences.

## 2.7. Blood sample collection and blood analysis

Blood  $CS_2$  concentrations were measured at the end of exposure. While atmospheric concentrations were maintained constant in the inhalation chambers, rats were removed individually using an airlock. Blood was collected from the tail vein in 8 rats from the  $CS_2$  exposure groups and from 18 control animals. As mentioned previously, animals were anesthetized with isoflurane gas during blood collection. The rats' tail tip was first warmed in water, at 39 °C, before blood collection. Blood samples ( $\sim 0.8$  mL) were dispensed into 2-mL heparinized vials and frozen at  $-20$  °C until analysis.

Blood samples were acidified with 250  $\mu$ L HCl (2%) to release bound  $CS_2$  and stirred for 10 min after the addition of 10  $\mu$ L of an IS solution (1.5 g/L MEK in DCM) (Lam and DiStefano, 1986). Samples were extracted with 500  $\mu$ L DCM. After shaking (for 30 min) and centrifugation (at 3220g and  $-4$  °C for 20 min), the DCM layer was analyzed using the same chromatographic conditions as described for atmospheric monitoring. In these conditions, linearity was demonstrated between the limit of quantification ( $=0.3$   $\mu$ g) and 15  $\mu$ g  $CS_2$ ; the limit of detection for the method was around 0.1  $\mu$ g, accuracy was less than  $-12.4\%$  and precision was close to 15%.

## 2.8. Urine collection and TTCA analysis

At the end of exposure, 8 animals per group and 18 controls were placed in individual metabolic-type stainless steel cages with free access to food and water from 3:00 pm to 9:00 am the following day. During this 18-h period, urine was collected and refrigerated by a cooling system surrounding the collection tubes. Urine samples were frozen immediately after collection and stored at  $-20$  °C until the day of analysis, when they were thawed just before use.

The TTCA concentration in urine was determined using an automated column-switching high-performance liquid chromatography system (Simon and Nicot, 1993). Briefly, dilute urine was purified on an anion-exchange column, the fraction of interest was transferred for isocratic analysis on a cyano-amino column. TTCA was detected by measuring UV absorption at 275 nm.

In these conditions, linearity was demonstrated between the limit of quantification ( $=0.15$  mg/L) and 50 mg/L; the limit of detection was below 0.05 mg/L; recovery exceeded 95% and within- and between-day precision were less than 1% and 4%, respectively.

## 2.9. Histological analyses

At the end of the noise and noise-plus- $CS_2$  exposures, cochleae were harvested from 14 control rats, 9 noise-exposed rats and 8 animals exposed to 250 ppm  $CS_2$  + noise for histological analyses (Table 1). The other animals ( $n = 86$ ) were returned to the animal

facility for a 4-week recovery period before the final histological analyses.

### 2.9.1. Light microscopy analyses

Immediately following exposure or after the 4-week post-exposure recovery period, animals were deeply anesthetized with ketamine/xylazine mixture (75/5 mg/kg) (i.p.) before decapitation and rapid removal of the cochleae. Both the round and the oval windows were opened and perfused with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer. Cochleae were immersed in the same fixative for 15 days at 4 °C, then rinsed in cacodylate buffer and post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide. Cochleae were drilled to obtain a thin layer of cochlear bone. Samples were decalcified and then dehydrated in graded concentrations of ethanol up to 100%, placed in (50/50) resin/propylene oxide, (75/25) resin/propylene oxide, and embedded in 100% resin (Epon/Araldite). After polymerization at 60 °C, semi-thin sections (2.5  $\mu$ m) were cut parallel to the mid-modiolar plane, stained with cresyl violet and observed using an Olympus BX41 light microscope.

### 2.9.2. Immunohistochemistry

At the end of exposure or following the 4-week post-exposure recovery period, deeply anesthetized animals were perfused by an intracardiac injection of heparinized saline solution followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS). Cochleae were removed, perfused through the oval and round windows and immersed in the same fixative for 24 h. Samples were stored at  $-20$  °C in a cryoprotective solution (glycerol 34.5%, ethylene glycol 30%, PBS 20%, water milliQ 15.5%) until labeling. Cochleae were drilled and dissected under a light microscope to remove the cochlear bone capsules, stria vascularis, tectorial and Reissner membranes. Organs of Corti were cut into three parts: the apical, medial and basal turns. Samples were rinsed and immersed in a blocking solution (5% donkey serum and 0.2% triton X-100 in PBS 1x) for 2 h at room temperature. They were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody solution: rabbit anti-myosin VIIa (25–6790, Proteus Biosciences, Ramona, CA, USA; 1:200) to visualize hair cells, and mouse anti-NF200 (N0142, Sigma, Kappelweg, Schnelldorf, Germany; 1:400) to label neurofilaments. After rinsing tissues in 0.2% triton X-100 in PBS ( $3 \times 15$  min), samples were incubated ( $2 \times 1$  h 30 at room temperature) in the secondary antibody solution: Alexa-488 donkey anti-rabbit (A21206, Invitrogen, Paisley, United Kingdom; 1:500) + Alexa-555 donkey anti-mouse (A31570, Invitrogen, Paisley, United Kingdom; 1:500) in 0.2% triton in PBS 1x. Samples were finally rinsed several times before mounting between slide and cover slip in Antifade<sup>®</sup> for observation using a Leica TCS-SL confocal microscope.

### 2.9.3. Scanning electron microscopy

At the end of the experiment, animals were perfused under deep anesthesia by an intracardiac injection of heparinized saline solution followed by 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer. Cochleae were removed from the skull, perfused and immersed in the same fixative for 24 h at 4 °C. They were then rinsed and immersed in 1% osmium tetroxide, 0.2 M cacodylate buffer for 1 h. Samples were drilled and dissected to expose the organ of Corti. After dehydration in graded ethanol solutions, ending with 100% ethanol, the samples were further treated with a critical-point dryer using liquid  $CO_2$ , followed by sputter-coating with gold. Samples were observed and images acquired with a JEOL7400F scanning electron microscope.

### 2.9.4. Cochleogram

After 4 weeks of recovery, deeply anesthetized animals were sacrificed and cochleae were quickly removed. The two windows

were opened and perfused with succinate dehydrogenase (SDH) solution (0.05 M sodium succinate, 0.05 M phosphate buffer and 0.05% tetranitroblue tetrazolium). Samples were incubated for 1 h in the SDH solution at 37 °C before fixing with 4% paraformaldehyde in PBS for at least 24 h. Subsequently, the cochleae were drilled and the organs of Corti were dissected into three parts and mounted in glycerin on glass slides. All hair cells with detectable SDH staining under a light microscope (Olympus BX41) were counted from the apex to the base of the organ of Corti. Cochleograms were produced for each animal using custom software based on the frequency-place map established by Müller (1991). Cochleograms were used to quantify hair cell loss as a function of distance from the apex of the cochlea.

### 2.10. Statistical analysis

A one-way ANOVA was used to analyze the statistical significance of variations in DPOAE amplitudes between exposed and control rats at each frequency. At the end of the exposure, the variations corresponded to  $AS = [DPOAE1 - DPOAE0] - K1$ . The constant K1 was taken as the average of  $[DPOAE1 - DPOAE0]$  calculated for the relevant control group. For the AS values at 3.6 kHz, a “Tobit” model was used to determine the mean and standard deviation of hearing loss, while also providing an estimate of the significance of differences between the control and exposed groups. This model makes it possible to take the censored DPOAE values, close to or in the background noise into account. After the 4-week recovery period, variations were computed as  $PAS = [DPOAE2 - DPOAE0] - K2$ . Where the constant K2 was taken as the average of  $[DPOAE2 - DPOAE0]$  calculated for the relevant control group. Statistical results were expressed as follows:  $F(df_b, df_r) = F\text{-ratio}$ ;  $p = p\text{ value}$ , in which  $df_b$  is the number of degrees of freedom between groups, and  $df_r$  is the number of residual degrees of freedom. A one-way ANOVA was also used to analyze weight variation (after exposure – before exposure) between groups. A multiple-range test was run to compare variations between groups. This test was performed using the Bonferroni method. Finally, a one-way ANOVA was used to analyze the TTCA concentration and CS<sub>2</sub> blood concentration between groups at the end of exposure. A multiple-range test was run to compare these variations between groups. This test was performed using the Bonferroni method.

The standard deviation, SD, is indicated throughout the article as an indicator of the variability of data distribution. The threshold for statistical significance was set to 5%.

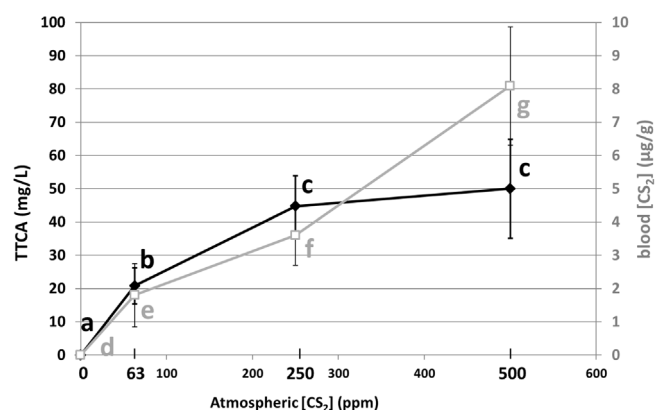
## 3. Results

### 3.1. General health

Animals' body weight only decreased in the groups exposed to 250 and 500 ppm of CS<sub>2</sub>. The weight differences recorded between all the CS<sub>2</sub>-exposed groups and the other groups (control and noise groups) were significant [ $F(4, 116) = 18.68$ ;  $p < 0.001$ ] at the end of the exposure. Animals exposed to 500 ppm lost weight ( $-6.6 \pm 2.2$  g), whereas controls put on weight ( $+8.0 \pm 0.8$  g). All rats ( $n = 117$ ) were in good health prior to anesthesia according to the standard definition presented by Morton and Griffiths, 1985.

### 3.2. CS<sub>2</sub>: atmospheric vs. blood concentrations

The relationship between atmospheric CS<sub>2</sub> concentrations and blood CS<sub>2</sub> concentrations measured at the end of exposure is plotted in Fig. 2. Blood samples were collected just after the end of the exposure period from eight CS<sub>2</sub>-exposed rats and 18 control rats. Significant differences [ $F(3, 41) = 121.78$ ;  $p < 0.001$ ] were



**Fig. 2.** Relationship between atmospheric CS<sub>2</sub> concentrations (ppm) and blood CS<sub>2</sub> or urinary TTCA concentrations. Right y-axis: blood CS<sub>2</sub> concentration (µg/g); left y-axis: urinary TTCA concentration (mg/L). CS<sub>2</sub>: carbon disulfide, TTCA: 2-Thio-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid. Statistical comparison was based on the Bonferroni method, and differences are represented by letters. Groups with the same letter are not significantly different, whereas those with different letters are. a,b,c: TTCA. d,e,f,g: CS<sub>2</sub> blood burden.

found between groups: 63 ppm CS<sub>2</sub> ( $1.8 \pm 1.0$  µg/g), 250 ppm CS<sub>2</sub> ( $3.6 \pm 0.9$  µg/g) and 500 ppm CS<sub>2</sub> ( $8.1 \pm 1.8$  µg/g). CS<sub>2</sub> concentrations in all samples from control rats were below the limit of detection for the method. The Bonferroni test indicated significant differences between the different groups, with blood CS<sub>2</sub> concentrations increasing as a function of the atmospheric CS<sub>2</sub> concentrations.

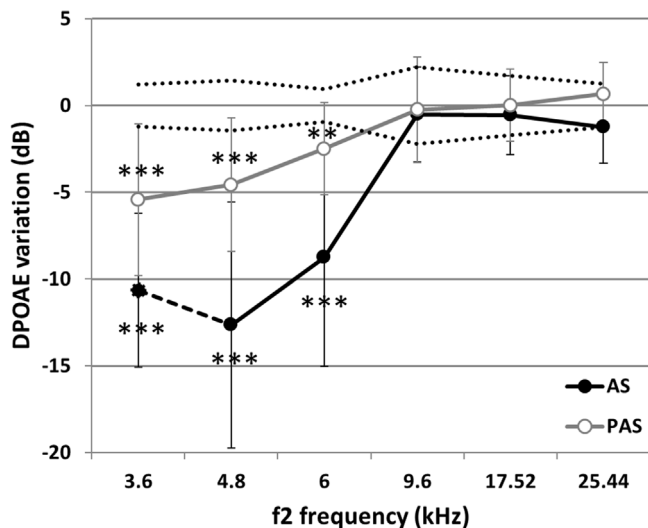
### 3.3. Atmospheric CS<sub>2</sub> vs. urinary TTCA concentrations

Fig. 2 also shows the relationship between the main urinary metabolite (TTCA) as measured at the end of the exposure period, and the relevant atmospheric CS<sub>2</sub> concentrations. Urine samples were collected from 8 rats and 18 control rats for 18 h post-exposure. A statistically significant difference was observed between groups [ $F(3, 41) = 90.63$ ;  $p < 0.001$ ]. In addition, a significant difference was shown between rats exposed to 63 ppm CS<sub>2</sub> ( $20.8 \pm 5.4$  mg/L) and rats exposed to a higher doses of CS<sub>2</sub>. In contrast, no significant difference was found between groups exposed to 250 ppm ( $44.7 \pm 9.2$  mg/L) and 500 ppm ( $50 \pm 14.8$  mg/L).

### 3.4. Hearing tests

#### 3.4.1. Continuous noise exposure

Exposure to continuous noise with a  $L_{EX,8h}$  of 105 dB SPL caused significant decreases in the DPOAE amplitudes measured between 3.6 and 6 kHz. The upper frequencies of the DPOAE variation were one octave higher than the three-octave band noise spectrum used for the exposure (0.5, 1 and 2 kHz). The maximum variation in AS was obtained at 4.8 kHz ( $-13 \pm 7$  dB), whereas variations in PAS were similar at 3.6 and 4.8 kHz ( $-5 \pm 4$  dB) (Fig. 3). The AS value at 3.6 kHz was calculated by a “Tobit” model to maintain information from censored DPOAE measurement values which were too close to or included in the background noise. Prior to exposure, the DPOAE amplitudes at 3.6 kHz were lower (approximately 12 dB) than those measured at other frequencies. Further DPOAE amplitude reduction following the exposure protocol made it impossible to measure a DPOAE value above the background noise for many of the rats. Therefore, the DPOAE could not be precisely measured at 3.6 kHz in the rat having suffered the greatest hearing loss. Therefore, the minimal AS values were used in a “Tobit” test to estimate the hearing loss at this frequency. The same procedure

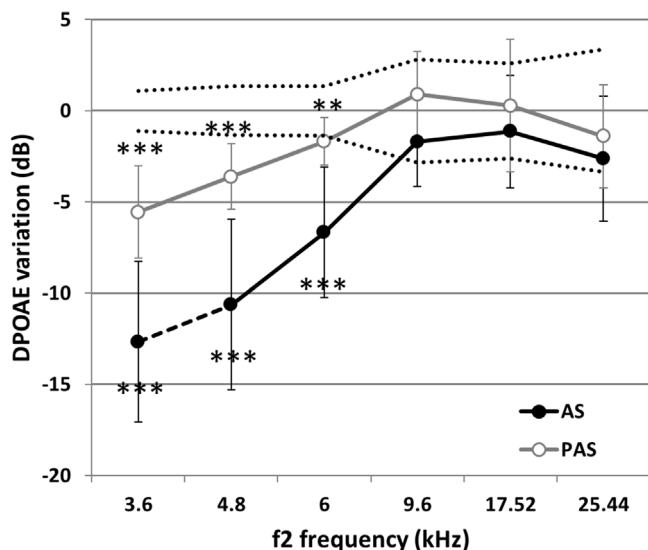


**Fig. 3.** DPOAE variations in the low-frequency noise group (LF). Black line:  $AS = [DPOAE1 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE1 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Gray line:  $PAS = [DPOAE2 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE2 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Values correspond to mean  $\pm$  SD. Dotted lines represent the variability in the AS control group (SD). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

was used for AS values at 3.6 kHz for all groups. After 4 weeks without noise, all rats had recovered making the measurement possible at all frequencies.

#### 3.4.2. 63 ppm $CS_2$ + noise exposure

Significant AS and PAS values were measured from 3.6 to 9.6 kHz. A slight, but not significant ( $p = 0.15$ ), increase in AS was noted at 9.6 kHz. The profile of the curves shown in Fig. 4 was similar to that obtained without  $CS_2$ , i.e., upon exposure to noise alone (Fig. 3). The amplitude shifts measured at 4.8 and 6 kHz were slightly (but not significantly) lower than those measured in the group exposed to noise alone.



**Fig. 4.** DPOAE variations in the group exposed to 63-ppm  $CS_2$  plus low-frequency noise. Black line:  $AS = [DPOAE1 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE1 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Gray line:  $PAS = [DPOAE2 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE2 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Values correspond to mean  $\pm$  SD. Dotted lines represent the variability in the AS control group (SD). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

#### 3.4.3. 250-ppm $CS_2$ + noise exposure

Compared to control animals (unexposed rats), the AS for the group exposed to 250-ppm  $CS_2$  + noise were significant from 3.6 to 9.6 kHz (Fig. 5). As a result, the frequency range affected by the AS was more extensive than that observed with exposure to noise alone (Fig. 3), and the tendency observed with the 63 ppm  $CS_2$  + noise group was confirmed.

However, after the 4-week recovery period, the frequency range affected by PAS was identical to that obtained in the noise-only exposure group: from 3.6 to 6 kHz (Fig. 5). Consequently, the extension of the window of damaged frequencies was temporary.

The DPOAE variations generated by 250 ppm  $CS_2$  + noise were lower at 4.8 and 6 kHz than those measured in the noise group (Fig. 3), in particular for AS values.

#### 3.4.4. 500 ppm $CS_2$ + noise exposure

The data obtained with 500 ppm  $CS_2$  + noise (Fig. 6), and with 250 ppm + noise (Fig. 5), were similar. The AS calculated from DPOAE measured at the end of exposure were significant from 3.6 to 9.6 kHz compared to the values determined for the control group, but the degree of significance was higher at 9.6 kHz than that recorded with the 250 ppm + noise group.

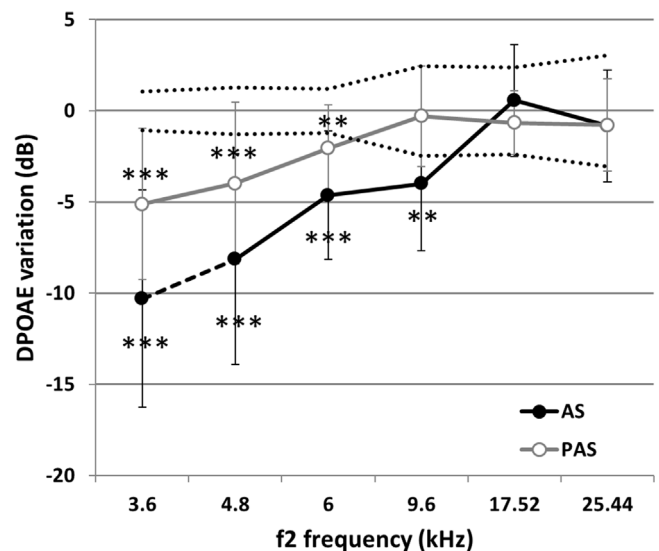
After the 4-week recovery period, the PAS based on DPOAE measurements were only significant in the frequency window ranging from 3.6 to 6 kHz. Variations in DPOAE and their statistical significance were slightly greater for the 500 ppm + noise exposure than for the 250 ppm + noise exposure condition.

As for the 250 ppm + noise group, the DPOAE variations of 500 ppm  $CS_2$  + noise group at 4.8 and 6 kHz were lower than those measured in the group exposed to noise alone.

### 3.5. Histological analyses

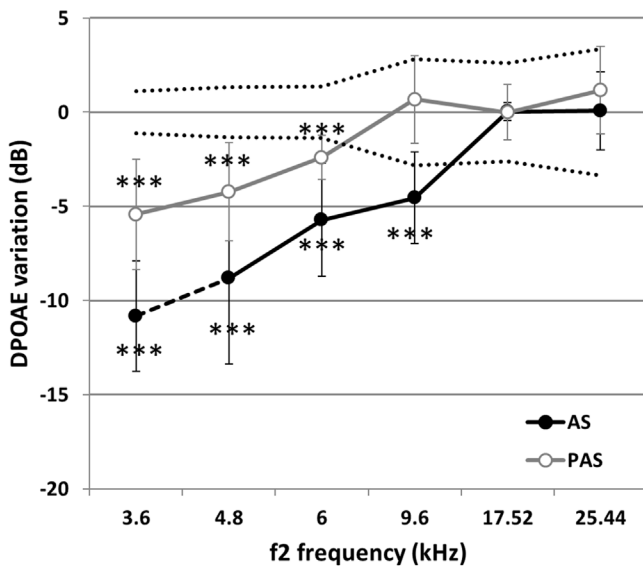
#### 3.5.1. Immunohistochemistry

Cochleae from all animals immunolabeled with anti-myosin VIIa and anti-neurofilament antibodies had similar morphological features throughout all cochlear segments at the end of the exposure period and after recover. As shown in Fig. 7, three rows of



**Fig. 5.** DPOAE variations in the 250-ppm  $CS_2$  plus low-frequency noise group. Black line:  $AS = [DPOAE1 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE1 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Gray line:  $PAS = [DPOAE2 - DPOAE0]_{Expo} - [DPOAE2 - DPOAE0]_{Ctrl}$ . Values correspond to mean  $\pm$  SD. Dotted lines represent variability in the AS for the control group (SD). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.





**Fig. 6.** DPOAE variations in the 500-ppm CS<sub>2</sub> plus low-frequency noise group. Black line: AS = [DPOAE1–DPOAE0]<sub>Expo</sub> – [DPOAE1–DPOAE0]<sub>Ctrl</sub>. Gray line: PAS = [DPOAE2–DPOAE0]<sub>Expo</sub> – [DPOAE2–DPOAE0]<sub>Ctrl</sub>. Values correspond to mean ± SD. Dotted lines represent variability in the AS control group (SD). \*\*\* p < 0.001, significantly different from the mean for the control group, Bonferroni test.

OHCs and one row of inner hair cells could be identified thanks to the anti-myosin VIIa antibody. No loss of hair cells related to any treatment was observed. The anti-neurofilament antibody consistently labeled the afferent terminals contacting the inner hair cells, and no differences were observed between exposed (Fig. 7A) and control (Fig. 7B) animals, either following exposure or after the recovery period. Neither the noise nor the CS<sub>2</sub> + noise co-exposure caused overt effects in the distribution of afferents and their neurofilament content.

### 3.5.2. Light microscopy

The organ of Corti and the spiral ganglion were examined in semi-thin sections from epoxy-resin-embedded specimens. In all sections, the morphology was similar to that described in the

literature for control adult rats. In the organ of Corti, the inner hair cells, three rows of OHCs, Deiters' cells and Hensen's cells were observed with normal morphological features. Normal morphology was maintained for control group (Fig. 8C) and for all exposure groups, including rats exposed to 500 ppm-CS<sub>2</sub> + noise (Fig. 8A), and all cochlear regions, including the apical turn of the cochlea, which is the region dedicated to the discrimination of low-frequencies. The organ of Corti was no different at the end of exposure and after the 4-week post-exposure recovery period. Moreover, the spirals ganglion images of control rats (Fig. 8D) were similar to those of exposed rats (Fig. 8B). No damage to the spiral ganglion cells was induced by exposure to noise or co-exposure to CS<sub>2</sub> + noise. Therefore, the cochleae remained morphologically intact regardless of the exposure conditions and the moment of observation.

### 3.5.3. Cochleogram

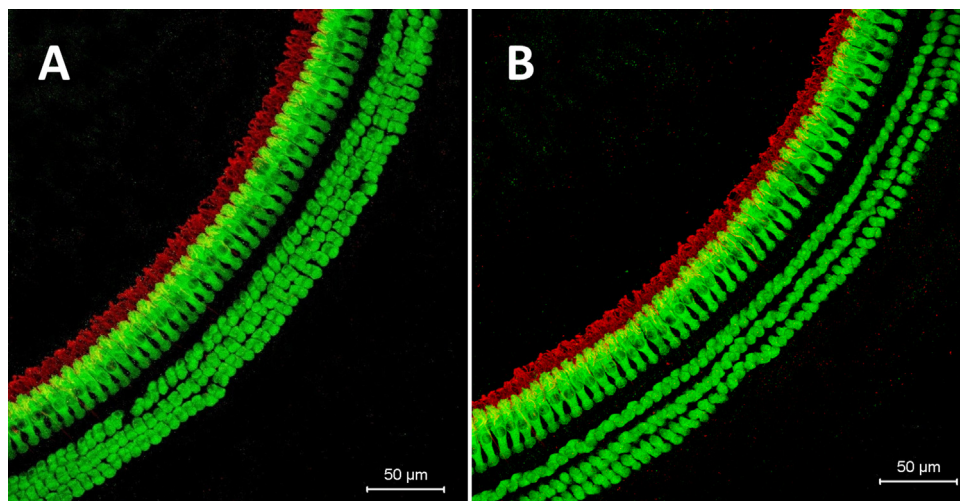
After the recovery period, the cochleograms obtained for the control (Fig. 9) and exposed groups were similar. Regardless of the group considered, very small numbers of hair cells were lost along the organ of Corti. For all the groups, loss of inner hair cells and of hair cells from the first row of OHC never exceeded 1%, and in the second and third rows of OHC losses of 1 or 2% were recorded.

Fig. 10 shows an average cochleogram obtained from four rats exposed to low-frequency continuous noise plus 500-ppm CS<sub>2</sub>. Similar cochleograms were obtained for all the other groups tested, including controls (Fig. 9). Although the hearing loss induced by the low-frequency noise was significant, no cell loss was visible on the cochleograms. Like for exposure to noise alone, co-exposure to noise and solvent did not visibly alter the cochleogram (Fig. 10).

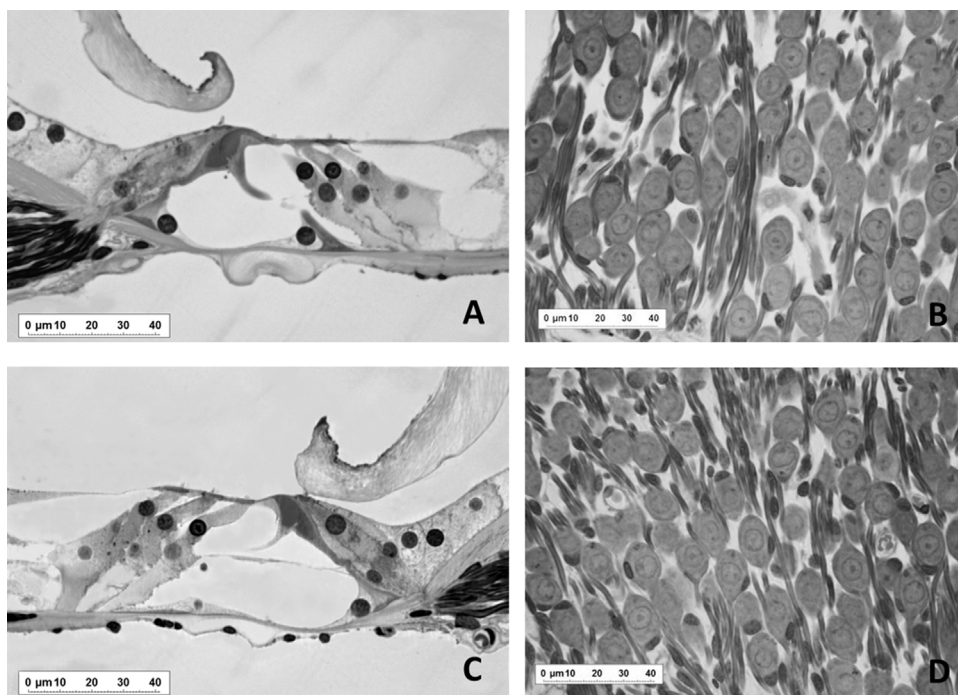
The absence of some OHCs seen at the extreme base (over 50 kHz) reported in the cochleogram is not due to CS<sub>2</sub>, but to the morphology of the organ of Corti. The organ of Corti is narrow in this region, so inner hair cells appear first, followed by the first, second, and finally the third row of OHCs.

### 3.5.4. Scanning electron microscopy

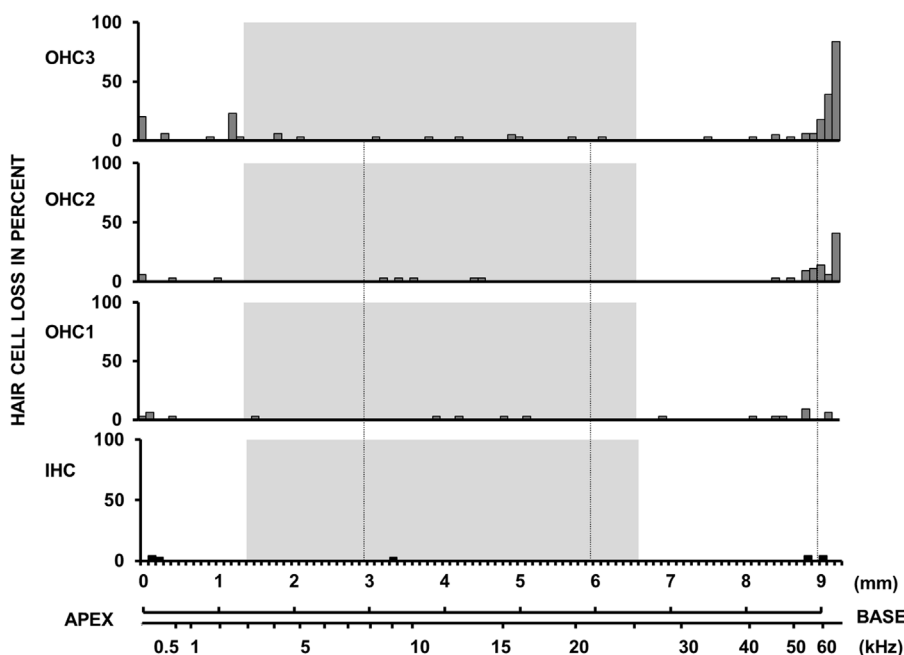
Auditory sensory epithelia were observed by scanning electron microscopy in control rats and in rats exposed to low-frequency noise alone and in rats co-exposed to both noise and 250-ppm of



**Fig. 7.** Representative image of the auditory sensory epithelia showing the organ of Corti immunolabeled with the rabbit anti-myosin VIIa antibody (green) and the mouse anti-neurofilament 200 (red). Yellow color corresponds to overlapping of the green and red signals. The images show organs of Corti from the middle turn around 6 and 7 kHz of a rat from the group exposed to 250 ppm of CS<sub>2</sub> plus noise for 4 weeks (A) and a control rat (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 8.** Representative image of the auditory sensory epithelia from a rat co-exposed to CS<sub>2</sub> plus noise. The light microscopy image was acquired at the end of the recovery period. Image of an organ of Corti (A) and apical spiral ganglion (B) from a rat exposed to 500-ppm CS<sub>2</sub> plus noise for 4 weeks. Image of an organ of Corti (C) and apical spiral ganglion (D) from a control rat.



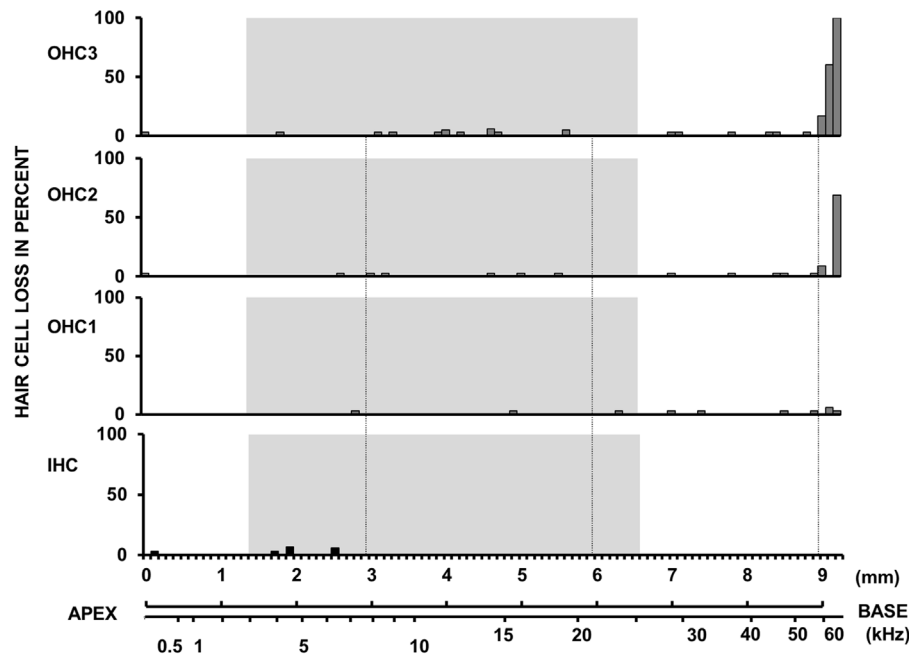
**Fig. 9.** Average cochleogram ( $n = 4/\text{group}$ ) from control group 4 weeks after recovery period. X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 second row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.

CS<sub>2</sub> (but not other concentrations). Regardless of the group, no evidence of injury to stereociliae was observed (Fig. 11B,C).

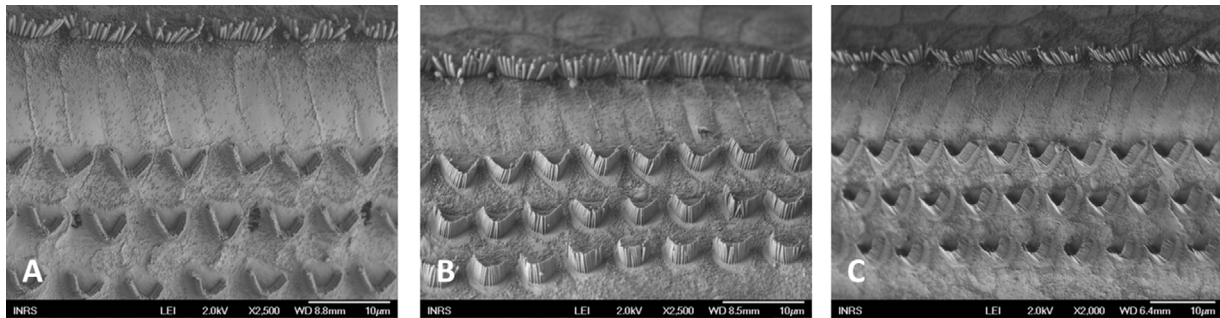
In fact, samples from all these animals looked like control samples (Fig. 11A). These data demonstrated that neither the low-frequency noise nor the combination of noise and CS<sub>2</sub> caused injury to stereociliae.

#### 4. Discussion

Following exposure to noise and/or solvent, all rats were in good health and showed no signs of suffering: no prostration, food intake was normal, and animals' fur had a good-looking aspect. Some effects on body weight were observed, with decreased



**Fig. 10.** Average cochleogram ( $n=4/\text{group}$ ) 4 weeks after exposure to low-frequency continuous noise plus 500-ppm of  $\text{CS}_2$ . X-axis – upper trace: distance (mm) along the spiral course of the organ of Corti – lower trace: frequency-map. Y-axis: percent hair cell loss. IHC: Inner hair cells; OHC1 first row of outer hair cells, OHC2 second row of outer hair cells, OHC3 third row of outer hair cells. The gray area indicates the frequency range explored using DPOAE-based hearing tests.



**Fig. 11.** Scanning electron micrographs of organs of Corti from Long Evans rats at approximately 9 kHz.

(A): Organ of Corti (X 2500) from a control animal showing the organization of stereociliae on the outer hair cells and inner hair cells.

(B): Organ of Corti (X 2500) from a rat exposed to low-frequency noise.  $L_{\text{EX},8\text{h}}$  105 dB SPL, 6 h per day, 5 days per week for 4 weeks.

(C): Organ of Corti (X 2000) from a rat co-exposed to noise and  $\text{CS}_2$  (250-ppm). Low-frequency noise ( $L_{\text{EX},8\text{h}}$  of 105 dB SPL) plus 250-ppm of  $\text{CS}_2$ , 6 h per day, 5 days per week for 4 weeks.

weight only in groups exposed to 250 and 500 ppm of  $\text{CS}_2$ . The greatest weight loss was observed at 500 ppm, at  $-6.6 \pm 2.2$  g. In contrast, control animals put on weight ( $+8.0 \pm 0.8$  g). In general, 2.6% total bodyweight was lost following exposure to 500 ppm  $\text{CS}_2$ , which is a reasonable proportion. These data are consistent with the scientific literature, where weight loss caused by exposure to  $\text{CS}_2$  has previously been reported (Hirata et al., 1992; Rebert and Becker, 1986).

In the current study, the actual  $\text{CS}_2$  exposure was assessed by determining  $\text{CS}_2$  concentrations in blood, and TTCA in urine. The metabolite provides a specific and sensitive measurement of exposure to  $\text{CS}_2$  (Campbell et al., 1985; Drexler et al., 1995), and is used today as a relevant biological indicator of occupational exposure to  $\text{CS}_2$  (Thienpont et al., 1990). The data obtained showed an increase in blood  $\text{CS}_2$  concentration, and in the urinary concentration of TTCA which was proportional to the atmospheric  $\text{CS}_2$  concentration.

In terms of the metabolite, the increase in TTCA between 250 and 500 ppm of  $\text{CS}_2$  was only 12%, even though the atmospheric

$\text{CS}_2$  concentration doubled. In contrast, a 115% increase in TTCA was observed between 63 and 250 ppm of  $\text{CS}_2$  (a 4-fold increase in exposure). These results suggested saturation of the metabolic pathway for  $\text{CS}_2$  conjugation at higher atmospheric concentrations. But the strong increase in blood concentration from 250 ppm (Fig. 2) leads us to suspect that all the metabolic pathways were saturated in our animals. This saturation is in agreement with previous observations (Kivistö et al., 1995; Moorman et al., 1998). Indeed, Kivistö et al., 1995, demonstrated that urinary excretion of TTCA in rats exposed to 50 or 500 ppm for 6 h was not affected by pre-treatment with P-450 enzyme inducers or glutathione depletors. In addition, Moorman et al., 1998, showed that the circulating  $\text{CS}_2$  concentration in rats exposed by inhalation to 500 and 800 ppm for 13 weeks compared to animals exposed to 50 ppm was higher than would be predicted if the relationship between atmospheric concentration and received dose were directly proportional.

The spectrum of the noise to which animals were exposed was spread out over the three octave bands (frequency ranged from



0.35 to 2.8 kHz). Just after the exposure period, a hearing loss was recorded over a frequency window ranging from the lowest frequencies measurable with DPOAEs (3.6 kHz) up to 6 kHz (Fig. 3). This hearing loss extended to more than one octave beyond the spectrum of the noise exposure, and was thus broader than expected. Indeed, it has been reported that the mid-frequency-induced hearing loss is located half an octave above the noise spectrum (Campo et al., 2011; McFadden, 1986). After a 4-week recovery period, the frequency window for the hearing loss was identical, although the magnitude decreased around 5 dB. Thus, there was partial recovery of the peripheral auditory capacity. Interestingly, this hearing loss was not associated with histopathological damage. At the end of the exposure period, no evidence of excitotoxicity was observed. Thus, we found no alteration at the level of neurofilament expression in the afferent terminals associated with the IHC, nor hair cell loss. No vacuolization underneath the inner hair cells reflecting excitotoxicity was observed at the end of the exposure period. The density of the cellular bodies and their morphological features were comparable in control and exposed rats (whatever the exposure group). In addition, the stereociliae had a perfectly normal aspect. While DPOAEs are a specific indicator of global OHC function (Avan et al., 2001), no histopathological changes were found to explain the decrease in DPOAE amplitudes.

This unexpected result could be explained by a number of mechanisms. First, a slight mechanical decoupling of the stereociliae from the tectorial membrane (Zwislocki, 1984) or a modification in the stiffness of the stereociliar rootlets could have affected the mechanosensory process of transduction at the level of the OHCs (Liberman and Dodds, 1987). Alternatively, a dysfunction in the feedback control loop of the OHC could have caused reorganization of the synapses underneath the hair cells of the organ of Corti (Liberman and Kujawa, 2017) for both types of neuron terminations or an alteration of the efferent fibers (90% of which are connected to OHC). In both of these cases, the number of cellular nuclei and fibers would remain unchanged, despite the inefficacy of the auditory peripheral system.

At the end of the exposure period, the auditory deficits measured at noise-injured frequencies (3.6, 4.8 and 6 kHz) in co-exposed animals were lower than those recorded in rats exposed to noise alone. This effect of CS<sub>2</sub> was already observable at 63 ppm. This observation may be somewhat unexpected, but we know that, in the case of other solvents, moderate concentrations can have a neuropharmacological effect which prevails over their cochleotoxic effects (Campo et al., 2014; Carreres Pons et al., 2017). This neuropharmacological effect consists in a significant decrease in the threshold of noise/sound required to trigger the middle-ear reflex, one of these functions of which is to reduce the acoustic energy reaching the cochlea.

The neuropharmacological effect of CS<sub>2</sub> on the middle-ear reflex was assessed with 63 ppm, which is 12 times the European threshold limit value and only 3 times the American TWA; the effect becomes obvious at 250 ppm.

However, CS<sub>2</sub> is not known to be a cochleotoxic agent like aromatic solvents, but is more likely to be an ototoxic agent causing a retrocochlear pattern of hearing loss (Hodgkinson and Prasher, 2006; Vyskocil et al., 2012). In the present experiment, neuropharmacological effects were detectable at all concentrations, which is not the case with cochleotoxic solvents (Campo et al., 2014).

Compared to the effects of noise alone, which were restricted to a window up to 6.3 kHz, co-exposure to CS<sub>2</sub> plus noise resulted in a dose-dependent broadening of the window of injury, with frequencies up to 9.6 kHz affected. At 63 ppm, the 2-dB deficit at 9.6 kHz was not significant, but the tendency was nevertheless clear. Interestingly, at the end of the 4-week recovery period, the

frequency range injured in the co-exposed groups was identical to that in the group exposed to noise alone. Therefore, the extension of the injury to a broader frequency range upon exposure to CS<sub>2</sub> appears to be a temporary phenomenon. Temporary hearing loss due to CS<sub>2</sub> exposure has previously been reported in rats (Hirata et al., 1992) and may also occur in humans (Hirata et al., 1996).

The enlargement of the window of affected frequencies could be explained by a central effect, and more specifically the efferent pathway which could alter the function of the peripheral sound receptor. It is noticeable that impaired frequencies neighbored the noise-injured frequencies (9.6 kHz vs. 6 kHz). Consequently, it is possible that CS<sub>2</sub> alters the metabolism of the nerve cells involved in the discrimination of acoustic frequencies through the so-called tonotopic process.

## 5. Conclusions

CS<sub>2</sub> can potentiate the effects of noise over a broader frequency range than noise alone. The phenomenon is temporary and does not seem to generate permanent supplementary auditory deficits. No morphological change was revealed at the level of the inner ear, which means that the functional deficits recorded in the present study could not be explained by major injury to the organ of Corti, or the ganglion neurons.

However, in the present study, exposure to CS<sub>2</sub> lasted only 4 weeks, which is quite short compared to other studies reporting neurotoxic effects of CS<sub>2</sub> at the level of the auditory pathways. In case of longer exposure, during an occupational career, the effect could be permanent as related by epidemiological studies. It is clear that a follow-up of the workers co-exposed to noise and CS<sub>2</sub> should be taken into consideration in hearing conservation programs.

The results obtained reinforce the need to consider co-exposures when determining occupational threshold limits.

## Funding

This work was supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France) and by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) – FEDER (grant number BFU2015-66109-R) and the Generalitat of Catalonia (grant number SGR 943).

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Joseph Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with rat handling and husbandry and Aurélie Remy for her contribution to the statistical analyses.

The confocal microscopy studies were performed at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). We thank Benjamín Torrejon-Escribano for advice on confocal imaging.

## References

- Avan, P., Bonfils, P., Mom, T., 2001. Correlations among distortion product otoacoustic emissions, thresholds and sensory cell impairments. *Noise Health* 3, 1–18.
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Goldberg, L., 1983. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 11, 169–278. doi:<http://dx.doi.org/10.3109/10408448309128255>.

- Bohne, B.A., Harding, G.W., 2000. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am. J. Otol.* 21, 505–509.
- Burdick, C., 1982. Hearing Loss from Low-frequency Noise. .
- Campbell, L., Jones, A.H., Wilson, H.K., 1985. Evaluation of occupational exposure to carbon disulphide by blood, exhaled air, and urine analysis. *Am. J. Ind. Med.* 8, 143–153.
- Campo, P., Venet, T., Rumeau, C., Thomas, A., Rieger, B., Cour, C., Cosnier, F., Parietti-Winkler, C., 2011. Impact of noise or styrene exposure on the kinetics of presbycusis. *Hear. Res.* 280, 122–132. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2011.04.016.
- Campo, P., Morata, T.C., Hong, O., 2013. Chemical exposure and hearing loss. *Dis. Mon. DM* 59, 119–138. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.01.003.
- Campo, P., Venet, T., Thomas, A., Cour, C., Brochard, C., Cosnier, F., 2014. Neuropharmacological and cochleotoxic effects of styrene. Consequences on noise exposures. *Neurotoxicol. Teratol.* 44, 113–120. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.009.
- Carreres Pons, M., Chalansonnet, M., Venet, T., Thomas, A., Nunge, H., Merlen, L., Cosnier, F., Llorens, J., Campo, P., 2017. Carbon disulfide potentiates the effects of impulse noise on the organ of Corti. *Neurotoxicology* 59, 79–87. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.003.
- Chang, S.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Chen, C.-J., Chang, H.-Y., Sung, F.-C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- Chen, G.-D., Henderson, D., 2009. Cochlear injuries induced by the combined exposure to noise and styrene. *Hear. Res.* 254, 25–33. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2009.04.005.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255.
- Cox, C., Que Hee, S.S., Lynch, D.W., 1996. Urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) as the major urinary marker of carbon disulfide vapor exposure in rats. *Toxicol. Ind. Health* 12, 81–92. doi:http://dx.doi.org/10.1177/074823379601200105.
- DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union.*
- Dannhof, B.J., Bruns, V., 1993. The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66, 8–22.
- Drexler, H., Göen, T., Angerer, J., 1995. Carbon disulphide. II. Investigations on the uptake of CS<sub>2</sub> and the excretion of its metabolite 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid after occupational exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 5–10.
- Göen, T., Schramm, A., Baumeister, T., Uter, W., Drexler, H., 2014. Current and historical individual data about exposure of workers in the rayon industry to carbon disulfide and their validity in calculating the cumulative dose. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 87, 675–683. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00420-013-0910-9.
- Gottfried, M.R., Graham, D.G., Morgan, M., Casey, H.W., Bus, J.S., 1985. The morphology of carbon disulfide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 6, 89–96.
- Henley, C.M., Owings, M.H., Stagner, B.B., Martin, G.K., Lonsbury-Martin, B.L., 1990. Postnatal development of f21-f2 otoacoustic emissions in pigmented rat. *Hear. Res.* 43, 141–148.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338.
- Hirata, M., Ogawa, Y., Goto, S., 1996. A cross-sectional study on nerve conduction velocities among workers exposed to carbon disulphide. *Med. Lav.* 87, 29–34.
- Hodgkinson, L., Prasher, D., 2006. Effects of industrial solvents on hearing and balance: a review. *Noise Health* 8, 114–133.
- Johnson, B.L., Boyd, J., Burg, J.R., Lee, S.T., Xintaras, C., Albright, B.E., 1983. Effects on the peripheral nervous system of workers' exposure to carbon disulfide. *Neurotoxicology* 4, 53–65.
- Kivistö, H., Elovaara, E., Riihimäki, V., Aitio, A., 1995. Effect of cytochrome P450 isozyme induction and glutathione depletion on the metabolism of CS<sub>2</sub> to TTCA in rats. *Arch. Toxicol.* 69, 185–190.
- Knobloch, K., Stetkiewicz, J., Wronska-Nofer, T., 1979. Conduction velocity in the peripheral nerves of rats with chronic carbon disulphide neuropathy. *Br. J. Ind. Med.* 36, 148–152.
- Kobel, M., Le Prell, C.G., Liu, J., Hawks, J.W., Bao, J., 2016. Noise-induced cochlear synaptopathy: past findings and future studies. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2016.12.008.
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular effects in viscose rayon workers exposed to carbon disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. doi:http://dx.doi.org/10.1179/107735201800339713.
- Kurabi, A., Keithley, E.M., Housley, G.D., Ryan, A.F., Wong, A.C.-Y., 2016. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.013.
- Lam, C.W., DiStefano, V., 1986. Characterization of carbon disulfide binding in blood and to other biological substances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 235–242.
- Liberman, M.C., Dodds, L.W., 1987. Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear. Res.* 26, 45–64.
- Liberman, M.C., Kujawa, S.G., 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003.
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies—accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. doi:http://dx.doi.org/10.1111/joim.12030.
- Müller, M., 1991. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear. Res.* 51, 247–254.
- McFadden, D., 1986. The curious half-Octave shift: evidence for a basalward migration of the traveling-Wave envelope with increasing intensity. In: Salvi, R. J., Henderson, D., Hamernik, R.P., Colletti, V. (Eds.), *Basic and Applied Aspects of Noise-Induced Hearing Loss*. Springer, US, Boston MA, pp. 295–312. doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-5176-4\_21.
- Moorman, M.P., Sills, R.C., Collins, B.J., Morgan, D.L., 1998. Carbon disulfide neurotoxicity in rats: II. Toxicokinetics. *Neurotoxicology* 19, 89–97.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moser, T., Predoehl, F., Starr, A., 2013. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol. Neurotol. Off. Publ. Am. Otol. Soc. Am. Neurotol. Soc. Eur. Acad. Otol. Neurotol.* 34, 995–1004. doi:http://dx.doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182814d4a.
- Newhook, R., Meek, M.E., 2002. Carbon Disulfide, Concise International Chemical Assessment Document. World Health Organization, Geneva.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Partanen, T., Hernberg, S., Nordman, C.H., Sumari, P., 1970. Coronary heart disease among workers exposed to carbon disulphide. *Br. J. Ind. Med.* 27, 313–325.
- Pouyatos, B., Gearhart, C.A., Fechter, L.D., 2005. Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 46–56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.015.
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–541.
- Riihimäki, V., Kivistö, H., Peltonen, K., Heliö, E., Aitio, A., 1992. Assessment of exposure to carbon disulfide in viscose production workers from urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid determinations. *Am. J. Ind. Med.* 22, 85–97.
- Rolecki, R., Tarkowski, S., 2000. Draft Document for Carbon Disulfide. Lodz, The Nofer Institute of Occupational Medicine.
- Sulsky, S.I., Hooven, F.H., Burch, M.T., Mundt, K.A., 2002. Critical review of the epidemiological literature on the potential cardiovascular effects of occupational carbon disulfide exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, 365–380. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00420-001-0309-x.
- Takebayashi, T., Omae, K., Ishizuka, C., Nomiya, T., Sakurai, H., 1998. Cross sectional observation of the effects of carbon disulfide on the nervous system, endocrine system, and subjective symptoms in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.* 55, 473–479.
- Thienpont, L.M., Depoort, G.C., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., 1990. Liquid chromatographic determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid isolated from urine by affinity chromatography on organomercurial agarose gel. *Anal. Chem.* 62, 2673–2675.
- Vanhoorne, M.H., Ceulemans, L., De Bacquer, D.A., De Smet, F.P., 1995. An epidemiologic study of the effects of carbon disulfide on the peripheral nerves. *Int. J. Occup. Environ. Health* 1, 295–302. doi:http://dx.doi.org/10.1179/oeh.1995.1.4.295.
- Venet, T., Campo, P., Thomas, A., Cour, C., Rieger, B., Cosnier, F., 2015. The tonotopicity of styrene-induced hearing loss depends on the associated noise spectrum. *Neurotoxicol. Teratol.* 48, 56–63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.02.003.
- Vyskocil, A., Truchon, G., Leroux, T., Lemay, F., Gendron, M., Gagnon, F., Majidi, N.E., Boudjerida, A., Lim, S., Emond, C., Viau, C., 2012. A weight of evidence approach for the assessment of the ototoxic potential of industrial chemicals. *Toxicol. Ind. Health* 28, 796–819. doi:http://dx.doi.org/10.1177/0748233711425067.
- Wang, Y., Hirose, K., Liberman, M.C., 2002. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 3, 248–268. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s101620020028.
- Zwislocki, J.J., 1984. How OHC lesions can lead to neural cochlear hypersensitivity. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 97, 529–534. doi:http://dx.doi.org/10.3109/00016488409132931.





# Combined exposure to carbon disulfide and low-frequency noise reversibly affects vestibular function

Running title: Carbon disulfide and noise effects on balance

Monique Chalansonnet<sup>1,\*</sup>, Maria Carreres-Pons<sup>1,3</sup>, Thomas Venet<sup>1</sup>, Aurélie Thomas<sup>1</sup>, Lise Merlen<sup>1</sup>, Carole Seidel<sup>1</sup>, Frédéric Cosnier<sup>1</sup>, Hervé Nunge<sup>1</sup>, Benoît Pouyatos<sup>1</sup>, Jordi Llorens<sup>3,4</sup>, Pierre Campo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de Recherche et de Sécurité. Rue du Morvan. CS 60027. F-54519 Vandœuvre Cedex. France

<sup>2</sup>DevAH EA 3450 – Développement, Adaptation et Handicap. Régulations cardio-respiratoires et de la motricité-Université de Lorraine. F-54500 Vandœuvre. France

<sup>3</sup>Departament de Ciències Fisiològiques and Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

<sup>4</sup>Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia, Spain

---

\* Corresponding author: Institut National de Recherche et de Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre Cedex, France.  
E-mail address: monique.chalansonnet@inrs.fr

## **Acronyms**

CS<sub>2</sub>: carbon disulfide

VOR: vestibulo-ocular reflex

PRN: post-rotatory nystagmus

PCR: Polymerase chain reaction

dB(A): A-weighted decibel

## **Highlights**

1. Co-exposure to low-frequency noise and carbon disulfide temporarily perturbs vestibular function.
2. Carbon disulfide alone causes a reversible decrease of post-rotatory nystagmus saccade number; low-frequency noise alone has no effect.
3. No evidence of carbon disulfide-induced peripheral vestibulotoxicity was found.
4. Carbon disulfide may trigger reversible central neurochemical effects that impair the vestibulo-ocular reflex.

## Abstract

Chronic occupational exposure to carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) has debilitating motor and sensory effects in humans, which can increase the risk of falls. Although no mention of vestibulotoxic effects is contained in the literature, epidemiological and experimental data suggest that CS<sub>2</sub> could cause low-frequency hearing loss when associated with noise exposure. Low-frequency noise might also perturb the peripheral balance receptor through an as-yet unclear mechanism. Here, we studied how exposure to a low-frequency noise combined with 250-ppm CS<sub>2</sub> affected balance in rats.

Vestibular function was tested based on post-rotary nystagmus recorded by a video-oculography system. These measurements were completed by behavioral tests and analysis of the cerebellum to measure expression levels for gene expression associated with neurotoxicity. Assays were performed prior to and following a 4-week exposure, and again after a 4-week recovery period. Functional measurements were completed by histological analyses of the peripheral organs.

Nystagmus was unaltered by exposure to noise alone, while CS<sub>2</sub> alone caused a moderate 19% decrease of the saccade number. In contrast, co-exposure to 250-ppm CS<sub>2</sub> and low-frequency noise decreased both saccade number and duration by 33% and 34%, respectively. After four weeks, recovery was only partial but measures were not significantly different from pre-exposure values.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of cerebellar tissue revealed a slight but significant modification in expression levels for two genes linked to neurotoxicity in CS<sub>2</sub>-exposed animals. However, neither histopathological changes to the peripheral receptor nor behavioral differences were observed. Based on all these results, we propose that the effects of CS<sub>2</sub> were due to reversible neurochemical disturbance of the efferent pathways managing post-rotatory nystagmus. Because the nervous structures

involving the vestibular function appear particularly sensitive to CS<sub>2</sub>, post-rotary nystagmus could be used as an early, non-invasive measurement to diagnose CS<sub>2</sub> intoxication as part of an occupational conservation program.

**Key-words**

Carbon disulfide; Low-frequency noise; Post-rotatory nystagmus; Rat; Vestibular system.

## 1. Introduction

Carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) is a lipophilic solvent used in the production of viscose rayon and in agriculture (Rolecki and Tarkowski, 2000); it is also a metabolic product of the therapeutic drug disulfiram, used to treat chronic alcoholism (Goh and Morgan, 2017; Strume, 1965). Chronic exposure to CS<sub>2</sub> is linked to several symptoms including neuropsychiatric, motor and sensory disturbances (Sułkowski et al., 1992) as well as vascular complications (Chang et al., 2007; Wood, 1981). Similar symptoms have been observed in both animals (Hoffmann and Müller, 1990) and humans (Kotseva et al., 2001). Today, CS<sub>2</sub> is classed as a neurotoxic compound capable of causing distal axonopathies (Graham et al., 1995; Llorens, 2013; Pappolla et al., 1987). In addition, CS<sub>2</sub>-induced low-frequency hearing loss and effects on balance have been reported in humans (Chang et al., 2003; Morata, 1989; Sułkowski et al., 1992). However, we currently lack information on possible vestibulo- or cochleo-toxic effects.

Since the 1980s, a small number of animal studies have shown that noise, and more specifically low-frequency noise, is detected by, and perturbs, the vestibular receptor (Cazals et al., 1982; Tamura et al., 2012). Therefore, both solvents and noise could affect balance. Because solvents have been shown to potentiate the cochleo-traumatic effects of noise (Campo, 2015; Morata et al., 1993), it appeared necessary to study the impact of co-exposure to CS<sub>2</sub> and low-frequency noise on the vestibular system, and thereby on balance.

Vestibular function can be assessed by measuring the vestibulo-ocular reflex (VOR). In an attempt to compensate for rotation of the head, the VOR generates eye movement to stabilize the image on the retina. During the acceleration phase of rotation, these eye movements generate nystagmus, a cyclic activity composed of a slow phase that is the result of the VOR, and a rapid phase, or resetting saccade, which is controlled by the central nervous system and brings the eyes back to the initial position before beginning a new cycle. Nystagmus is the

result of the vestibular nuclei receiving afferent signals from semicircular canals, and sending efferent signals to the abducens and oculo-motor nuclei, which control eye movements (Goldberg et al., 2013). The cerebellum plays an essential role in optimizing all classes of reflexes, it guarantees the precision of ocular movements to optimize visual performance and is central to both real-time control and long-term calibration and learning (Beh et al., 2017).

Odkvist et al., 1979 were the first to describe use of the VOR to assess the toxicity of solvent toward the vestibular system. These authors observed alterations to the VOR in both rabbits and humans after exposure to solvents. A decade later, Nylén et al., 1991 and Niklasson et al., 1993 used the same technique to detect impaired balance in rats. These results demonstrate that exposure to solvents can perturb the balance function, and that the amplitude of the effect can be assessed by VOR measurements.

One manifestation of the VOR is the post-rotary nystagmus (PRN). The PRN is the nystagmus observed after the end of a sustained rotation, due to inertial movement of the endolymph, the fluid in the inner ear that plays a critical role in vestibular transduction. PRN analyses have been proposed to detect brainstem and cerebellar disorders (Angelaki et al., 1995, 1996; Wennmo et al., 1981), and as a clinical test to investigate possible toxic effects of drugs on the vestibular system (Song et al., 1997). For example, PRN was used to study how metals affect balance (Mameli et al., 2001, 2006).

In addition to eye movements, the vestibular system also controls posture and body movement. In laboratory rodents, vestibular dysfunction leads to altered motor behavior and defects in several reflex responses. A number of behavioral tests have been validated to assess vestibular function by examining this behavior (Boadas-Vaello et al., 2005, 2017; Llorens et al., 1993; Llorens and Rodríguez-Farré, 1997; Soler-Martín et al., 2007)

An extensive literature search revealed no animal studies of the effects of CS<sub>2</sub> on the vestibular system, or of the effects of simultaneous exposure to noise and CS<sub>2</sub>. Therefore, we chose to assess functional perturbation of the central and peripheral vestibular systems in Long Evans rats using PRN and behavioral tests. Rats were exposed daily (6 hours) to 250-ppm CS<sub>2</sub> and/or noise for 4 weeks. The CS<sub>2</sub> concentration, which is equivalent to about 40 times the European threshold limit value (TLV, 5 ppm over 8 hours, *i.e.*, 6.6 ppm over 6 hours), was selected based on a preliminary dose-response study, as it was the lowest dose inducing PRN changes when combined with low-frequency noise. Finally, the effects of the exposure on the vestibular receptors were assessed by histological analyses, and effects on cerebellar mRNA expression were measured by quantitative RT-qPCR.



## **2. Materials and Methods**

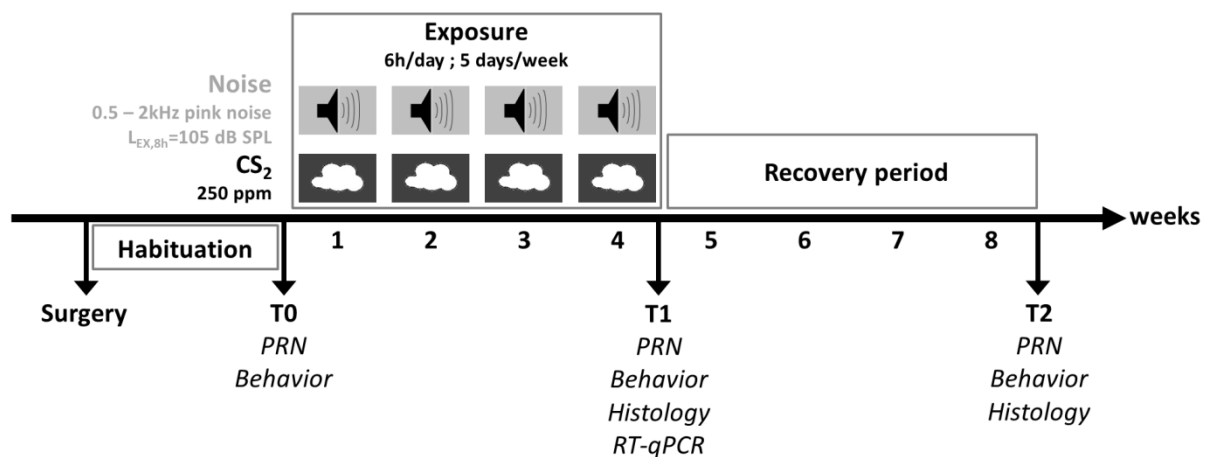
### **2.1 Animals**

The animal facilities are fully accredited (authorization n° D 54-547-10) by the French Ministry of Agriculture. While conducting the research described in this article, investigators adhered to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the European parliament and council (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010). The study, referenced as APAFIS#3950-201602051 1372481, was approved by the Ministry of Education and Research. Adult female Long Evans rats (n=133) weighing approximately 250 g were used in all experiments. Animals were purchased from Janvier breeders (Le Genest St Isle, St Berthevin, France). Rats were 8 weeks old when they arrived at the animal facility and they were acclimatized to the laboratory conditions for several weeks before starting experiments (animals were 18 weeks old at the beginning of experiments). They were housed two per cage (1032 cm<sup>2</sup> x 20 cm height) on irradiated cellulose BCell8 bedding (ANIBED, Pontvallain, France). A 12:12 h light:dark cycle (07:30-19:30) was maintained along with a constant temperature of 22±2 °C and relative humidity of 55±10%. Food and tap water were available *ad libitum*, except during exposure. The background noise level in the animal facility was approximately 43.5 dB(A). Animals were weighed weekly and monitored for overall toxicity, as defined by Morton and Griffiths, 1985.

### **2.2 Protocol**

An overview of the experimental protocol is shown in Figure 1.

*Insert Figure 1 about here*



**Figure 1. Experimental protocol.** Animals were exposed to 250-ppm carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) and noise 6 h/day, 5 days/week, for 4 weeks. The noise exposure was a pink noise filtered over three octave bands at 0.5, 1 and 2 kHz at a dose of L<sub>EX,8h</sub> = 105 dB SPL. Vestibular function was measured based on post-rotary nystagmus (PRN) and behavioral tests (tail-lift and air-righting) prior to exposure (T0), following exposure (T1), and 4 weeks post-exposure (T2). Histological analyses were done at the end of the exposure and post-exposure periods. RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction.

Animals were exposed to 250-ppm CS<sub>2</sub> alone, or to a low-frequency continuous noise with or without CS<sub>2</sub>. The L<sub>EX,8h</sub> of the noise was 105 dB SPL. The spectrum was a band-pass filtered over three octave bands at 0.5, 1 and 2 kHz. Exposure lasted 6 h per day over 5 consecutive days for 4 weeks. The number of controls and exposed animals are presented in Table 1.

Method	PRN	Behavior	LM	IHC	Scanning electron microscopy	RT-qPCR	
Time-points	T0 / T1 / T2	T0 / T1 / T2	T1 T2	T1 T2	T2	T1	Total number of animals
Controls	41	20	10 10	10 6	6	8	65
CS <sub>2</sub>	8	8	5 5	5 3	0	0	16
Noise	12	8	0 0	0 0	4	0	30
CS <sub>2</sub> + Noise	13	8	4 4	4 3	4	8	22

**Table 1. Number of control and exposed animals used in the different experimental conditions.** Several experimental techniques were performed on the same animals. CS<sub>2</sub>: carbon disulfide; PRN: post-rotary nystagmus; IHC: immunohistochemistry; LM: light microscopy; RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction; T0: prior to exposure; T1: right after exposure; T2: 4-week post-exposure.

Vestibular function was measured based on PRN and behavioral tests. These tests were performed prior to and after exposure, and 4 weeks post-exposure. Thirty eight animals were sacrificed at the end of the exposure period to allow morphological analyses and perform immunohistochemistry (Table 1). The remaining 62 animals were left in their home cage to recover for 4 weeks. At the end of the experiment, all animals received a deep dose of anesthesia and were euthanized to collect the brain and the vestibular sensory epithelia.

### **2.3 Anesthesia**

Prior to surgery, rats were anesthetized by a single injection of a mixture of ketamine/xylazine (45/5 mg/kg). Body temperature was monitored throughout the procedure using a rectal probe connected to a system maintaining a body temperature between 34 and 36 °C. For tissue collection, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (75/5 mg/kg).

### **2.4 Surgical procedure**

To immobilize the animal during the PRN procedure, a screw nut was placed on the skull. Surgery was performed two weeks before performing measurements. An incision of about 1.5 cm long was made in the skin over the vertex under sterile conditions. The skull was cleared by cutting through the connective tissue, scraped, and devitalized by applying silver nitrate. A thin layer of cyanoacrylate glue was spread on the dried skull to affix the screw nut to the bone. The nut was then embedded in dental cement (Taab 2000®). Rats were isolated during the recovery period and monitored closely for two weeks.

### **2.5 Habituation period**

One week after surgery, the animals were progressively habituated to the PRN procedure. The first step consisted in a simple manipulation of the rats. Then, they were immobilized in a dark room with a soft snuggle-restraint device leaving the head free. The final step was to immobilize the head using the screw. In total, the habituation phase lasted 10 days before starting PRN measurements.

## **2.6 Post-rotatory nystagmus test**

Experiments were carried out during daylight hours in a darkroom. The test apparatus consisted of a dark circular arena (102.5 cm diameter) containing a horizontal turntable. A system to hold a rat was fixed on the turntable, centered 88 mm from the rotation axis. As a result, the rat was rotated around its own body axis (located approximately between its shoulder blades). The metal plate, cylinder, turntable, camera holder and all the other custom equipment were made at INRS (France).

To stabilize the animal's head during rotation, it was held with a screw placed on a metal bar in the center of the turntable. The head was fixed at 30 ° with the nose pointing down to horizontally align the lateral semicircular canals. The turntable could rotate 360 °. The maximal acceleration and deceleration were 870 °/s<sup>2</sup>. The rotatory stimulation lasted 40 seconds at 90 °/s. After rotation, horizontal movement of the left pupil was recorded in the dark using an RK-826PCI eye tracker, which is a high-resolution infra-red camera recording system (240 Hz sampling rate; ISCAN, Inc. 21 Cabot Road Woburn, MA 01801 USA), placed in a holder on the wall. The VOR parameters recorded were the number and duration of saccades (see Fig. 2C-E). Occasionally, the rat temporarily closed its eyes during the post-rotation period, preventing continuous capture. In these cases, it was impossible to count the saccade number, but its duration could still be measured. This explains the differences in numbers of animals included in the PRN saccade number and duration data presented in the results.

## **2.7 Behavioral tests**

Two motor reflex tests suitable for the quantitative evaluation of vestibular dysfunction in rats were used (Martins-Lopes et al., 2017)

(1) The tail-lift reflex test consists in lifting the rat by the tail and observing their behavior: healthy rats exhibit a “landing” response with forelimb extension, whereas rats

suffering from vestibular dysfunction bend ventrally, sometimes “crawling” up toward their tails. The angle between the vertex/tail root line and the vertex/nose line was captured by high-speed video recordings (GoPro hero 4 black edition) and analyzed using Kinovea software.

(2) The air-righting reflex test consists in dropping the animals in supine position from a height of 40 cm onto a foam cushion. Healthy rats can right themselves in the air, whereas vestibular dysfunction prevents righting. The duration of the air-righting movement was measured by video recordings using the same equipment as the tail-lift reflex test.

## **2.8 Carbon disulfide**

During exposure, all rats (controls, noise, CS<sub>2</sub>-, or noise + CS<sub>2</sub>-exposed) were housed in individual cells within an inhalation chamber designed to sustain a dynamic, adjustable airflow (5-6 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>). The chambers were maintained at a negative pressure of no more than 3 mm H<sub>2</sub>O. Input air was filtered and conditioned to a temperature of 22±1 °C and relative humidity of 55±10%. CS<sub>2</sub> was generated using a thermoregulated glass streamer. The solvent was delivered by a pump and instantaneously vaporized upon contact with the heated surface of the glass streamer. The vapor was carried forward with an additional airflow through the streamer, into the main air inlet pipe of the exposure chambers. Rats were exposed to 250 ppm CS<sub>2</sub>, 6 h per day for 5 consecutive days over 4 weeks. Control animals (n=65) were always ventilated with fresh air. The exposure levels were determined from samples of the chamber's atmosphere collected using glass tubes packed with Carboxen 1000 40/60 mesh (Supelco). CS<sub>2</sub> was desorbed from the adsorbent with methylene chloride. Methyl-ethyl-ketone was added as an internal standard (IS) and samples were analyzed on a gas chromatograph/mass spectrometer (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu). CS<sub>2</sub> samples were assayed on a 30 m × 0.25mm (1 µm film thickness) Rtx-1701 column (with integra-guard)

(Restek), using helium as the carrier gas at a linear velocity of 45 cm/sec. The column temperature program was 40 °C for 3 min followed by an increase to 100 °C at a rate of 20 °C/min. The sample (1 µL) was injected in split mode with a split ratio of 1/30. Temperatures for the injection port, transfer line and ion source were set to 240 °C, 250 °C and 200 °C, respectively. The mass spectrometer was operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring mode, tracking ions 43 (for IS) and 76 (for CS<sub>2</sub>). Daily calibrations were performed. During exposure, a benchtop mass spectrometer (OmniStar GSD 320 O2) with yttrium-iridium filament (Pfeiffer vacuum) was also used to continuously monitor the stability of vapor generation throughout the exposure period.

## **2.9 Noise exposure**

The system used, methodology and type of noise are described in Venet et al., 2017. Briefly, noise exposure was performed within inhalation chambers. Rats were housed in individual cells inside the exposure chambers. The animals were exposed to noise in line with the schedule presented in Figure 1. The noise exposure lasted 6 h per day at 106 dB SPL. The noise was a filtered pink noise covering three octave bands ranging from 0.5 to 2 kHz. These frequencies correspond to the lowest range audible to rats, for which sensitivity is poor.

## **2.10 Histological analyses**

At the end of exposure, or at the end of the recovery period, the vestibular sensory epithelia (utricle, saccule and three cristae ampullaris) and the Scarpa ganglion were harvested from control and exposed rats for histological analysis. See Table 1 for details of animal numbers.

### ***Morphological analysis***

Cochleae were removed and vestibules fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer at 4 °C for one week before dissection under a light binocular microscope. Specimens were rinsed in cacodylate buffer, post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide and dehydrated in graded concentrations of ethanol up to 100%. They were then embedded in

resin (Epon/Araldite). After polymerization at 60 °C, embedded samples were cut to produce thin sections (2.5 µm) before staining with cresyl violet and observation under an Olympus BX41 optical microscope.

### ***Immunohistochemistry***

Vestibules were opened and immersed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C. The sensory epithelia were isolated and stored at -20 °C in a cryoprotective solution (34.5% glycerol, 30% ethylene glycol, 20% PBS, 15.5% distilled water) until labeling. For labeling, samples were rinsed and immersed in a blocking solution (20% donkey serum and 4% triton X-100 in PBS) for 90 min at room temperature before staining for 48 h at 4 °C with the primary antibody solution. Primary antibodies - a rabbit anti-myosin VIIa (25-6790, Proteus biosciences USA; 1:500) to visualize hair cells, and mouse anti-NF200 (N0142, Sigma Germany; 1:800) to visualize the neurofilaments in the afferent terminals - were prepared in PBS with 1% donkey serum and 0.1% triton X-100. After rinsing in PBS (4 x 10 min), the tissues were incubated overnight in darkness at room temperature with a secondary antibody solution: Alexa-488 donkey anti-rabbit (A21206, Invitrogen, United Kingdom; 1:500) + Alexa-555 donkey anti-mouse (A31570, Invitrogen, United Kingdom; 1:500) in 0.1% triton in PBS. Samples were rinsed several times and immersed in liquid gelatin (solid gelatin, 30% Bovine Serum Albumin, 20% sucrose in PBS) overnight at 4 °C, before embedding in solid gelatin with 9% glutaraldehyde. Blocks were post-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at 4 °C, and transverse sections (40 µm) were cut using a Leica VT1000 M vibrating blade microtome. Sections were mounted with Mowiol 4-88, and observed under a Leica TCS-SL confocal microscope.

### ***Scanning electron microscopy***

Cochleae were removed to expose vestibules to fixative (2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer) for 48 hours at 4 °C. Samples were then rinsed and immersed for 1 h in 1%

osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, rinsed once again and transferred to ethanol 70% for dissection to keep only the sensory epithelia. After dehydrating with graded ethanol concentrations up to 100% ethanol, samples were dried in a critical-point dryer using liquid CO<sub>2</sub>. They were finally sputter-coated with gold before observation under a JEOL7400F scanning electron microscope.

### **2.11 Gene expression analysis by RT-qPCR**

Total RNA from cerebellar tissue was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen™ #15596026). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed with iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) applying the following temperature cycle: 5 min at 25 °C, 30 min at 42 °C and 5 min at 85 °C.

Initially, a ready-made rat neurotoxicity PCR array (SAB Target List H96, Biorad) was used to screen for significant changes of expression among 86 genes involved in neurotoxic responses. cDNA from 3 to 4 rats from co-exposed and control groups were pooled in a solution containing 2x SsoAdvanced™ Universal Supermix (Biorad) and RNase-free water. The solution (20 µL) was deposited in each well. Real-time PCR was performed on a CFX96 Touch™ (BioRad) with the following temperature protocol: 2 min at 95 °C, 40 x (5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C). The fold-change for each target gene was expressed as the level for exposed animals vs. control animals after normalization for levels of three housekeeping genes (*Gapdh*, *Tbp* and *Hprt*). Only genes for which RNA expression levels were significantly different between exposed and control samples were re-analyzed by RT-qPCR for each individual animal.

For individual assays, real-time RT-qPCR was performed on a CFX96 Touch™ (BioRad) with iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) and primePCR™ primers according to the accompanying protocol. No template control was performed on PCR mixtures. For amplification, the following cycle was used: 5 min at 95 °C, 35 x (15 s at 95 °C and 60 s at



60 °C). The fold-change for target genes was expressed as the level for exposed animals with respect to control animals after normalization for three housekeeping genes (*β-actin*, *Rpl13* and *Hprt*, sequences available on request).

Only the data from the RT-qPCR performed on individual animals is shown in the results section.

## **2.12 Statistical analyses**

All data (weight, PRN, behavioral results) were statistically analyzed with repeated-measure two-way ANOVAs with “treatment” as between-subject factor and “time” as within-subject factor using Prism V7.03 (GraphPad. Software Inc., La Jolla, CA). Statistical results are expressed as follows: F(dfb, dfr)= F-ratio; p = p value, in which dfb is the number of degrees of freedom between groups, and dfr is the number of residual degrees of freedom. Bonferroni post-hoc comparisons were performed for each treatment group versus T0.

PRN data were expressed as a percentage of baseline (T0) values because of the extensive inter-individual variability of these measurements. Due to a skewed distribution of the RT-qPCR results for one gene, data were expressed as median [Q1; Q3], with Q1 and Q3 corresponding to 25 and 75% quartiles, respectively, and a non-parametric Mann-Whitney test was used to assess significance. All other data were expressed as mean ± SEM. The threshold for statistical significance was set at 95%.

### 3. Results

#### 3.1 General health

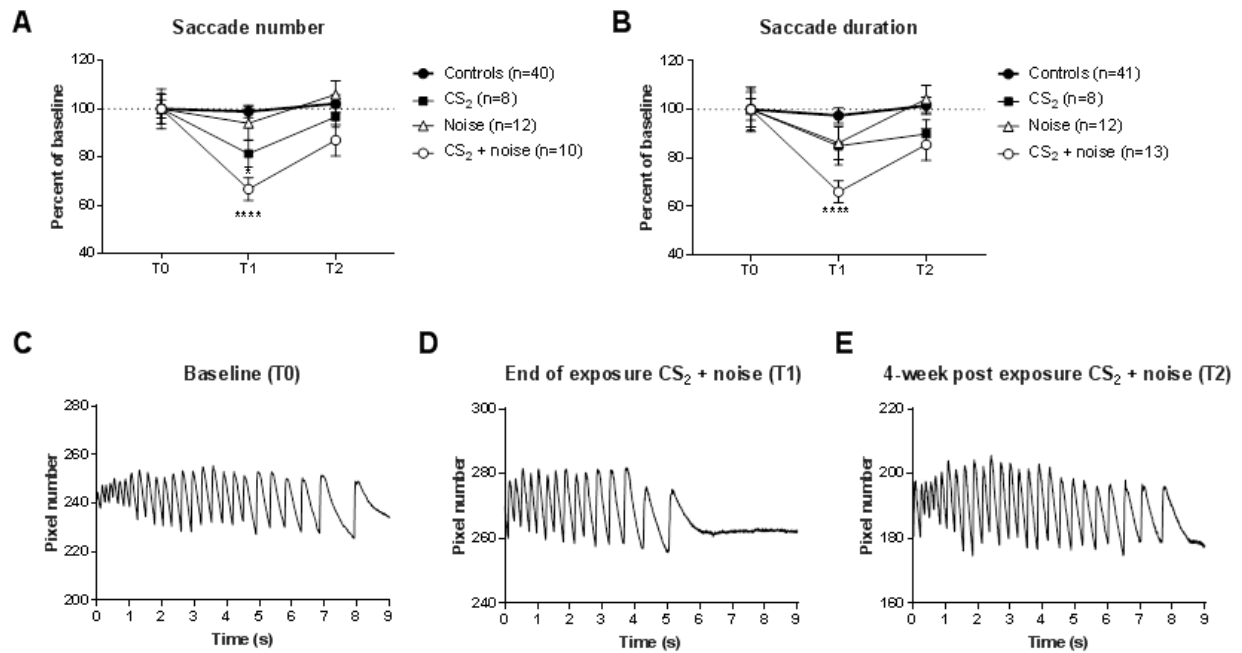
Over the 4 weeks of exposure, the weights of the animals exposed to CS<sub>2</sub> or CS<sub>2</sub> + noise remained stable between T0 and T1 (+0.5 g), while controls and animals exposed to noise alone gained an average of 8 g. The “treatment” x “time” interaction was  $F(3, 77) = 11.83$ ;  $p < 0.0001$ . However, according to the surveillance protocol, none of the rats showed signs of suffering during exposure. During the 4 weeks following the end of exposure, the animals exposed to CS<sub>2</sub> and CS<sub>2</sub> + noise gained more weight (+31 g) than controls or subjects exposed to noise alone (+16 g). As a result, there were no differences in weight between treatment groups at the end of the experiment [ $F(3, 53) = 2.376$ ;  $p = 0.0804$ ].

#### 3.2 Post-rotatory nystagmus

Figure 2 shows the average saccade number (A) and duration (B) measured for the different experimental groups before (T0), right after exposure (T1) and after 4 weeks’ recovery (T2). The interaction between “treatment” and “time” was significant (two-way ANOVA) for saccade number [ $F(6, 138) = 4.446$ ;  $p = 0.0004$ ] and duration [ $F(6, 140) = 3.328$ ;  $p = 0.0043$ ], and these two parameters remained stable at all time-points in controls and animals exposed to noise alone. Although exposure to CS<sub>2</sub> alone did not alter the duration of saccades (Fig. 2B), it decreased their number significantly at T1 ( $p = 0.024$  vs. T0; Fig. 2A). At T2, differences from baseline values were not significant for either parameter.

In contrast, co-exposure to CS<sub>2</sub> and noise resulted in significantly decreased saccade numbers and duration at T1 (-33%,  $p < 0.0001$  and -34%,  $p < 0.0001$ , respectively). These two measures partially recovered over the 4 weeks following exposure, and the difference from baseline values was no longer significant (number:  $p = 0.051$ ; duration:  $p = 0.061$ ).

Representative PRN traces acquired for the same animal at the three time-points, showing the effect of exposure to noise and CS<sub>2</sub>, are shown in Figure 2C-E.

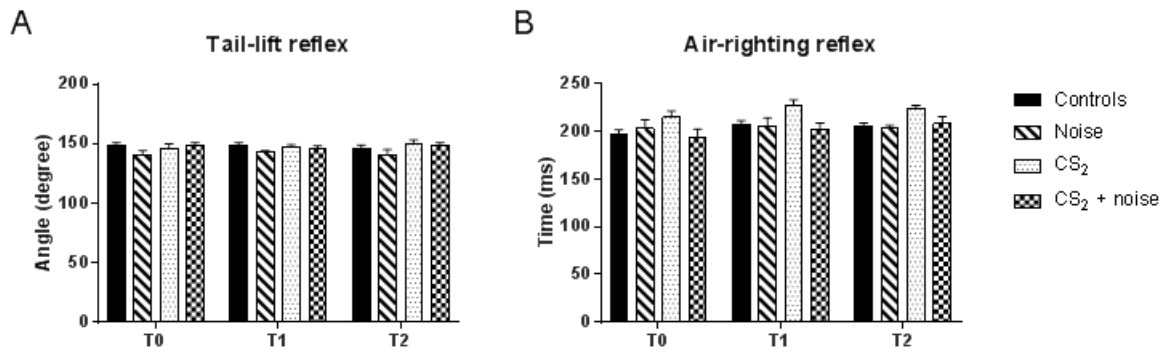


*Insert Figure 2 about here*

**Figure 2. Exposure to CS<sub>2</sub> + noise for 4 weeks significantly, but reversibly, alters post-rotatory nystagmus (PRN).** Saccade number (A) and duration (B) measured for each experimental group at T0, T1 and T2 expressed as percent of baseline. Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , significantly different from the T0 mean, Bonferroni test. Representative PRN traces recorded in a co-exposed animal prior to exposure (C), following 4 weeks of exposure (D) and after the 4-week recovery period (E).

### 3.3 Behavioral tests

The results of two tests to assess the integrity of the vestibular function (tail-lift reflex and air-righting reflex) are shown in Figure 3. None of the exposed groups showed altered performance, whatever the time point considered. The “treatment” x “time” interaction was not statistically significant for the tail-lift reflex [ $F(6, 44) = 0.6221$ ,  $p = 0.71$ ; Fig. 3A], or the air-righting reflex [ $F(6, 76) = 0.42$ ,  $p = 0.87$ ; Fig. 3B].

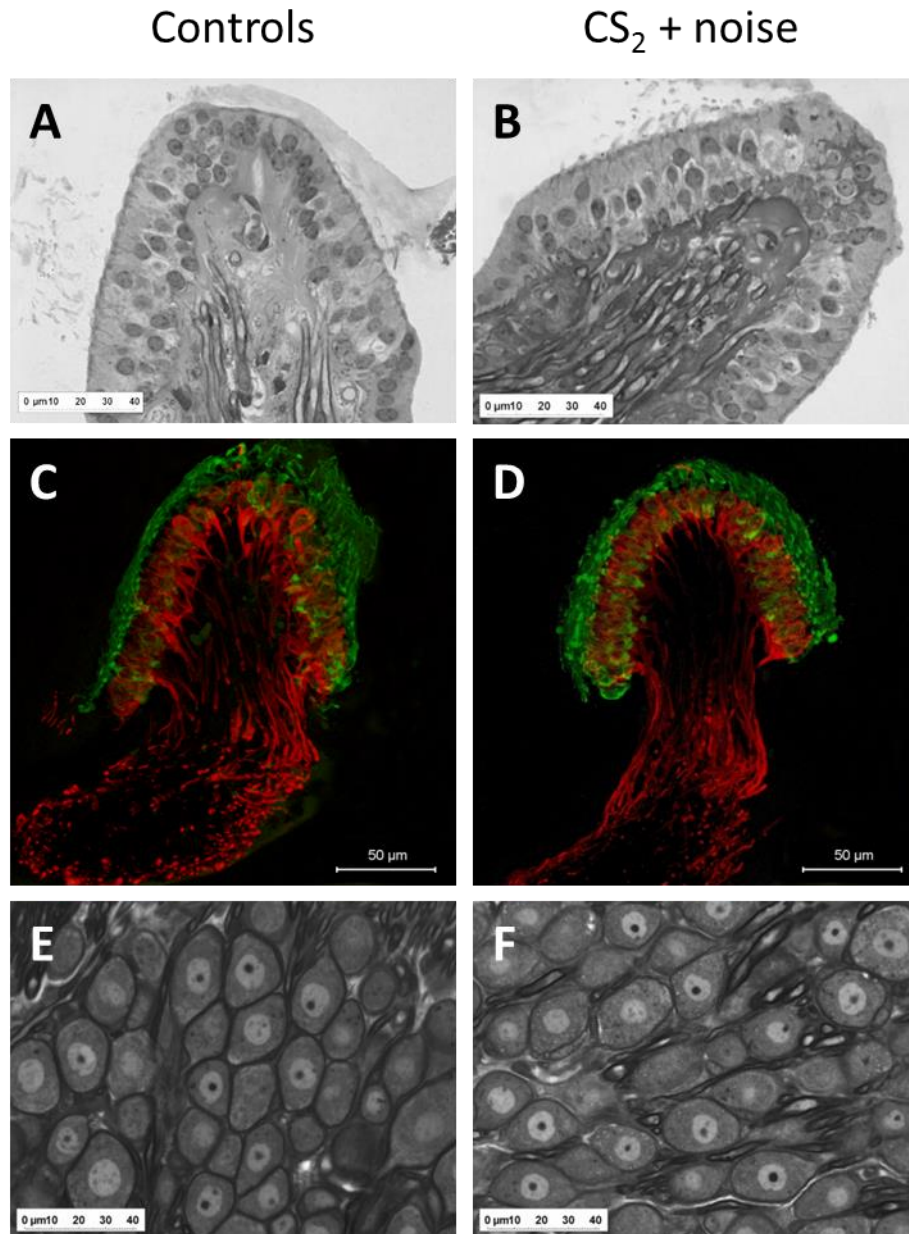


Insert Figure 3 about here

**Figure 3. Behavioral parameters are not affected by exposure to noise, CS<sub>2</sub> or a combination of both.** Vestibular function was assessed prior to (T0), at the end (T1), and 4-week after exposure (T2) by tail-lift (A) and air-righting reflex tests (B). Data are mean  $\pm$  SEM.

### 3.4 Histological analyses

Qualitative observations of *cristae ampullaris* harvested at T1 showed no morphological alteration in any of the experimental groups. Representative semi-thin sections from controls (Fig. 4A) and animals exposed to CS<sub>2</sub> + noise (Fig. 4B) had a normal sensory epithelium and no morphological impairment was observed. Immunohistochemical staining for myosin VIIa and neurofilament in the *crista ampullaris* appeared similar in controls (Fig. 4C) and co-exposed animals (Fig. 4D) at T1, and T2 (data not shown). Co-exposure was not associated with any obvious loss of hair cells, any alteration to the distribution of fibers or to their neurofilament content. Scarpa ganglion cells (Fig. 4E and F) were observed 4 weeks after the end of exposure (T2). No overt cell loss or morphological alteration was observed following co-exposure. *Stereociliae* on hair cells also appeared undamaged, as observed by scanning electron microscopy performed on samples from T2 (data not shown). The same histopathological analyses displayed in Fig. 4A-D were also performed on saccule and utricle, and a similar lack of alteration was found in exposed animals (data not shown).

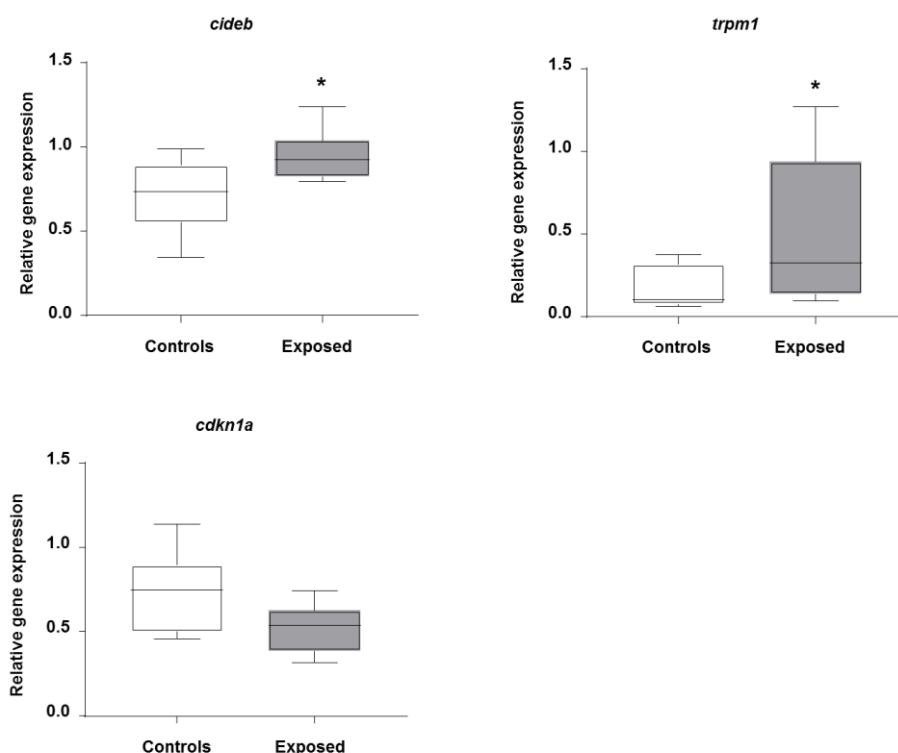


*Insert Figure 4 about here*

**Figure 4. CS<sub>2</sub> plus noise (right panels) induces no histological changes compared to control conditions (left panels).** Representative histological images are shown. The light microscopy *crista* images were acquired following exposure (T1) from a control (A) and a co-exposed rat (B). Representative crista sections labeled with antibodies directed against myosin VIIa (green) and neurofilaments (red), from control (C) and co-exposed (D) animals at the end of exposure (T1). Light microscopy images of Scarpa ganglion neurons from a control rat (E) and from an exposed animal (F) at the end of the recovery period (T2).

### 3.5 RT-qPCR

To examine the toxicity of co-exposure to CS<sub>2</sub> and noise at the level of the central nervous system, mRNA levels were analyzed in the cerebellum for three genes linked to neurotoxicity. Moderate but significant increases in mRNA levels for *cideb* (p=0.0205) - mainly implicated in apoptotic cell death - and *trpm1* (p=0.0401) - coding for a calcium-permeable cation channel - were observed in the cerebellum of exposed animals. In contrast, the mRNA level for cell cycle inhibitor *cdkn1a* tended to be reduced in exposed animals compared to controls (p=0.0541, Figure 5).



*Insert Figure 5 about here*

**Figure 5: Expression levels for *cideb*, *trpm1* and *cdkn1a* altered by exposure to CS<sub>2</sub> plus noise.** Expression levels were analyzed by RT-qPCR. Expression levels for  $\beta$ -actin, *Rpl13* and *Hprt* were used to normalize values. Results correspond to median [Q1; Q3] for 8 animals. \* indicates p<0.05 vs. control according to a Mann-Whitney test.

#### **4. Discussion & Conclusions**

In this study, the toxicity of CS<sub>2</sub>, alone or in combination with low-frequency noise, on the vestibular system was assessed by measuring how exposures affected the PRN, the results of behavioral tests and histological observations and expression levels in the cerebellum for genes linked to neurotoxicity.

To assess the toxicity of a compound, such as CS<sub>2</sub>, on a sensory system, physiological evaluation is the gold standard. To facilitate data interpretation, the methods employed to assess the adverse effects of exposure must be easily translatable from animals to humans, and share the same analytical rationale. In the case of the vestibular system, comparison between humans and rodents is facilitated by its evolutionary conservation (Day and Fitzpatrick, 2005). However, the vestibular system is intrinsically complex to study, and direct evaluation is difficult (Llorens et al. 2018). For this reason, vestibular function is generally indirectly assessed, for example by measuring the VOR.

VOR measurements are considered a suitable method to study disorders induced by toxic compounds in humans and animals, because perturbation of this reflex can be considered an early marker of adverse effects on the sensory/motor functions of the vestibular system, even in the absence of clinical signs. In addition, analysis of the VOR can be used to monitor how balance is controlled by both central and peripheral nervous structures (Cohen, 1984; Moschovakis, 1997; Pompeiano, 2006). Nevertheless, only a few studies have used the VOR to evaluate the toxicity of industrial chemicals (solvents, heavy metals, etc.) toward the vestibular system (Niklasson et al., 1993; Nylén et al., 1991; Tham et al., 1982), and even fewer have measured PRN (Larsby et al., 1986; Mameli et al., 2001, 2006).

The results of this study showed that a concentration of 250 ppm of CS<sub>2</sub> associated with low-frequency noise can temporarily alter the PRN, therefore disrupting the vestibular system. More precisely, combined exposure decreased the number of saccades and shortened the PRN duration. The simplest explanation for these changes is that the intensity of stimulus required to trigger the nystagmus is increased. Although the effect disappeared 4 weeks after the end of exposure, higher CS<sub>2</sub> concentrations may result in permanent impairment.

Our results confirm that the vestibular system is sensitive to CS<sub>2</sub>, adding evidence to reports showing that solvents or drugs can target the different components of this sensory system (Angelaki et al., 1995, 1996; Song et al., 1997; Yokel, 2000). In general, saturated halogenated hydrocarbons tend to depress the VOR, whereas unsaturated compounds or those containing a benzene core excite it (Odkvist et al., 1985). VOR effects have been reported for styrene, toluene, trichloroethylene and trichloroethane (Larsby et al., 1986; Niklasson et al., 1993; Tham et al., 1982), and metals such as lead and aluminum (Mameli et al., 2001, 2006) in rats, as well as with exposure of rodents to antiepileptic (phenytoin) or anticancer drugs (cisplatin) (Mameli et al., 1986; Takimoto et al., 2016).

Regardless of the exposure conditions, our results showed no significant alteration in two behavioral endpoints known to depend on the vestibular system, *i.e.*, the air-righting reflex (Ossenkopp et al., 1990) and the tail-lift reflex (Llorens et al., 1993). In addition, histological analysis of the peripheral vestibular system revealed no obvious damage: no hair cell loss, no damage to stereocilia, no loss of ganglion cells, and a normal distribution of nerve terminals. These normal behavioral and morphological results suggest that the functional modifications of the PRN observed in the animals exposed to CS<sub>2</sub> alone or CS<sub>2</sub> + noise were due to central disruption of balance control, as previously suggested by Kowalska et al., 2000 and Sułkowski et al., 1992. In a previous study, examining the effect of CS<sub>2</sub> and noise on the



auditory system, we also observed a temporary exacerbation of the effect of noise when combined with CS<sub>2</sub>, suggesting that this phenomenon was due to action of the solvent on the central nervous system (Venet et al., 2017).

In line with this “central” hypothesis, we detected significant overexpression of two genes - *cidebl*, involved in neuronal apoptosis (Inohara et al., 1998), and *trpm1*, involved in calcium-related excitotoxic mechanisms (Kraft and Harteneck, 2005; Lau and Tymianski, 2010) - and a trend for decreased expression of *cdkn1a*, an anti-apoptotic gene (Gartel and Tyner, 2002). Although the extent of changes to expression levels does not indicate a major neurotoxic insult due to exposure to 250-ppm CS<sub>2</sub> for 4 weeks, it nevertheless suggests cerebellar dysfunction. Among the functions of the cerebellum, the regulation of “velocity storage” is related to the control of balance. “Velocity storage” is believed to prolong the semicircular canal’s afferent signal, therefore extending the duration of the PRN (see Baumann et al., 2015 for review). We hypothesize that CS<sub>2</sub> could modify cerebellar neurotransmission controlling this velocity storage, although from our data we cannot provide a more precise explanation. Our observations are similar to those of Mameli et al., 2006, who described a reduction of PRN parameters following chronic intoxication with aluminum chloride. Like many authors (Angelaki et al., 1995, 1996; Song et al., 1997; Yokel, 2000), we conclude that PRN represents a sensitive indicator of neurotoxicity for a range of pollutants and drugs, regardless of their individual mechanisms of action.

The effects of CS<sub>2</sub> alone were consistently smaller than those obtained in animals exposed to CS<sub>2</sub> in combination with low-frequency noise, while low-frequency noise alone left PRN parameters unaltered. Hence, there is a true interaction between noise and CS<sub>2</sub>.

How and where this interaction takes place is unclear. Since noise is unlikely to disrupt central nuclei involved in the PRN, it is reasonable to suggest that its interaction with CS<sub>2</sub> occurs within the peripheral organ. Despite the fact that no morphological injury to the *cristae ampularis* was observed following exposure to noise, subtle physiological changes may nevertheless have occurred in the vestibule. For instance, low-frequency noise has been shown to cause a transient increase in the volume of the endolymph (Flock and Flock, 2000; Salt, 2004), although the underlying mechanism is not well understood (Salt and Hullar, 2010).

Our data confirm that CS<sub>2</sub> alone is not ototoxic, but because of its effect on the central nervous system it can temporarily disrupt the vestibular system, specifically control of the VOR. It is important to note that the duration and dose of CS<sub>2</sub> exposure in our work was relatively low compared to other studies, where CS<sub>2</sub> was used at between 200 ppm and 800 ppm over 11 to 15 weeks (Clerici and Fechter, 1991; Hirata et al., 1992; Rebert and Becker, 1986). The dose used in the present study was moderate with regard to the occupational TLV (40-fold higher than the current European TLV), and thus may better reflect potential occupational situations. The experimental results presented here reinforce those obtained by Morata, 1989 studying workers exposed to CS<sub>2</sub> (30 ppm) and noise (86-89 dBA). These authors reported earlier and more accentuated balance problems in co-exposed workers compared to workers exposed to noise alone.

Taken together, these human and animal data strongly suggest that preventive actions (personal protective equipment, improvement to processes and ventilation, etc.) should be recommended for workers who may be co-exposed to CS<sub>2</sub> and noise in order to reduce combined exposure as far as possible.

## **Funding**

This work was supported by the French Research and Safety Institute for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases (INRS, France) and by the Spanish Ministry for the Economy and Competitiveness (MINECO) - FEDER (grant number BFU2015-66109-R) and the Generalitat of Catalonia (grant number 2014 SGR 943).

## **Conflict of interest**

The authors have no competing interests to declare.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Marie-Jo Décret, Lionel Dussoul and Laurine Douteau for their help with animal handling and husbandry. We are also grateful to Benjamín Torrejon-Escribano, from the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB), for his help with the confocal microscopy. We acknowledge Aurélie Rémy, who performed the statistical analyses, Sylvie Sébillaud, who helped with the PCR experiments, and Benoît Cossec, for revision and suggestions on this manuscript.

## References

- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Arai, Y., Suzuki, J., 1996. Adaptation of primate vestibuloocular reflex to altered peripheral vestibular inputs. I. Frequency-specific recovery of horizontal VOR after inactivation of the lateral semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 76, 2941–2953. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.5.2941>
- Angelaki, D.E., Hess, B.J., Suzuki, J., 1995. Differential processing of semicircular canal signals in the vestibulo-ocular reflex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7201–7216.
- Baumann, O., Borra, R.J., Bower, J.M., Cullen, K.E., Habas, C., Ivry, R.B., Leggio, M., Mattingley, J.B., Molinari, M., Moulton, E.A., Paulin, M.G., Pavlova, M.A., Schmähmann, J.D., Sokolov, A.A., 2015. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 197–220. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0627-7>
- Beh, S.C., Frohman, T.C., Frohman, E.M., 2017. Cerebellar Control of Eye Movements. *J. Neuro-Ophthalmol. Off. J. North Am.* 37, 87–98. <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000000456>
- Boadas-Vaello, P., Riera, J., Llorens, J., 2005. Behavioral and Pathological Effects in the Rat Define Two Groups of Neurotoxic Nitriles. *Toxicol. Sci.* 88, 456–466. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi314>
- Boadas-Vaello, P., Sedó-Cabezón, L., Verdú, E., Llorens, J., 2017. Strain and Sex Differences in the Vestibular and Systemic Toxicity of 3,3'-Iminodipropionitrile in Mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 156, 109–122. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw238>
- Campo, P., 2015. Les ototoxiques exacerbent les surdités induites par le bruit.pdf. *Env. Risque Sante* 14, 125–134.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., 1982. Frequency sensitivity and selectivity of acoustically evoked potentials after complete cochlear hair cell destruction. *Brain Res.* 231, 197–203.
- Chang, S.-J., Chen, C.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Sung, F.-C., 2007. Risk for hypertension in workers exposed to carbon disulfide in the viscose rayon industry. *Am. J. Ind. Med.* 50, 22–27. <https://doi.org/10.1002/ajim.20409>
- Chang, S.-J., Shih, T.-S., Chou, T.-C., Chen, C.-J., Chang, H.-Y., Sung, F.-C., 2003. Hearing loss in workers exposed to carbon disulfide and noise. *Environ. Health Perspect.* 111, 1620–1624.
- Clerici, W.J., Fechter, L.D., 1991. Effects of chronic carbon disulfide inhalation on sensory and motor function in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(91\)90069-9](https://doi.org/10.1016/0892-0362(91)90069-9)
- Cohen, B., 1984. Examination of the vestibular system and of the vestibular-ocular reflex. Oosterveld WJ Ed *Otoneurology* John Wiley Sons Chichester 87–109.
- Day, B.L., Fitzpatrick, R.C., 2005. The vestibular system. *Curr. Biol. CB* 15, R583–586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.053>
- DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union.*
- Flock, A., Flock, B., 2000. Hydrops in the cochlea can be induced by sound as well as by static pressure. *Hear. Res.* 150, 175–188.
- Gartel, A.L., Tyner, A.L., 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 1, 639–649.

- Goh, E.T., Morgan, M.Y., 2017. Review article: pharmacotherapy for alcohol dependence - the why, the what and the wherefore. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45, 865–882. <https://doi.org/10.1111/apt.13965>
- Goldberg, M.E., Walker, M. F., Hundspeth, A. F., 2013. The Vestibular System, in: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. (Eds.), *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Education, New York, NY, pp. 917–934.
- Graham, D.G., Amarnath, V., Valentine, W.M., Pyle, S.J., Anthony, D.C., 1995. Pathogenetic Studies of Hexane and Carbon Disulfide Neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 91–112. <https://doi.org/10.3109/10408449509021609>
- Hirata, M., Ogawa, Y., Okayama, A., Goto, S., 1992. Changes in auditory brainstem response in rats chronically exposed to carbon disulfide. *Arch. Toxicol.* 66, 334–338. <https://doi.org/10.1007/BF01973628>
- Hoffmann, P., Müller, S., 1990. Subacute carbon disulfide exposure modifies adrenergic cardiovascular actions in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 115–120.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Núñez, G., 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17, 2526–2533. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526>
- Kotseva, K., Braeckman, L., De Bacquer, D., Bulat, P., Vanhoorne, M., 2001. Cardiovascular Effects in Viscose Rayon Workers Exposed to Carbon Disulfide. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 7–13. <https://doi.org/10.1179/107735201800339713>
- Kowalska, S., Sułkowski, W., Sińczuk-Walczak, H., 2000. Assessment of the hearing system in workers chronically exposed to carbon disulfide and noise. *Med. Pr.* 51, 123–138.
- Kraft, R., Harteneck, C., 2005. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* 451, 204–211. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>
- Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Odkvist, L.M., 1986. The effect of toluene on the vestibulo- and opto-oculomotor system in rats. A computerized nystagmographic study. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 101, 422–428.
- Lau, A., Tymianski, M., 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460, 525–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
- Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies– accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478–489. <https://doi.org/10.1111/joim.12030>
- Llorens, J., Dememes, D., Sans, A., 1993. The Behavioral Syndrome Caused by 3,3'-Iminodipropionitrile and Related Nitriles in the Rat Is Associated with Degeneration of the Vestibular Sensory Hair Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 199–210. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1238>
- Llorens, J., Rodríguez-Farré, E., 1997. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 117–127.
- Llorens, J., Callejoa, A., Greguskea, E., Marotoa, A., Cutillas, B., Martins-Lopes, V., 2018. Physiological assessment of vestibular function and toxicity in humans and animals. *Neurotoxicology*, in press.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, F., Solinas, A., Tavera, C., Ibba, A., Tocco, M., Flore, C., Sanna Randaccio, F., 2001. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. *Brain Res. Bull.* 55, 269–275.
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, P., Zambenedetti, P., Ramila, M., Zatta, P., 2006. Effect of aluminum consumption on the vestibulo-ocular reflex. *Metab. Brain Dis.* 21, 86–104. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9010-9>

- Mameli, O., Tolu, E., Melis, F., Caria, M.A., Sechi, G.P., Riu, P.L.D., 1986. Postrotatory Nystagmus During Phenytoin Treatment. *Epilepsia* 27, 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03557.x>
- Martins-Lopes, V., Bellmunt, A., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2017. Effective assessment of ototoxic-induced vestibular deficits by video analysis of anti-gravity reflexes in rats, in: 17th National Congress of the Spanish Society of Neuroscience Abstracts Book. p. 560.
- Morata, T., Dunn, D.E., Kretschmer, L.W., Lemasters, G.K., Keith, R.W., 1993. Effects of occupational exposure to organic solvents and noise on hearing. *Scand. J. Work. Environ. Health* 19, 245–254.
- Morata, T.C., 1989. Study of the effects of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on workers' hearing. *Scand. Audiol.* 18, 53–58.
- Morton, D.B., Griffiths, P.H., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431–436.
- Moschovakis, A.K., 1997. The neural integrators of the mammalian saccadic system. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d552-577.
- Niklasson, M., Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., 1993. Effects of toluene, styrene, trichloroethylene, and trichloroethane on the vestibulo- and opto-oculo motor system in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15, 327–334. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90034-L](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90034-L)
- Nylén, P., Larsby, B., Johnson, A.C., Eriksson, B., Höglund, G., Tham, R., 1991. Vestibular-oculomotor, opto-oculomotor and visual function in the rat after long-term inhalation exposure to toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 111, 36–43.
- Odkvist, L., Bergholtz, L., Larsby, B., Tham, R., Eriksson, B., Edling, C., 1985. Solvent-induced central nervous system disturbances appearing in hearing and vestibulo-oculomotor test. *Clin. Ecol.* 3(3), 149–153.
- Odkvist, L.M., Larsby, B., Tham, R., Aschan, G., 1979. On the mechanism of vestibular disturbances caused by industrial solvents. *Adv. Otorhinolaryngol.* 25, 167–172.
- Ossenkopp, K.P., Prkacin, A., Hargreaves, E.L., 1990. Sodium arsenite-induced vestibular dysfunction in rats: effects on open-field behavior and spontaneous activity in the automated digiscan monitoring system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 875–881.
- Pappolla, M., Penton, R., Weiss, H.S., Miller, C.H., Sahenk, Z., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1987. Carbon disulfide axonopathy. Another experimental model characterized by acceleration of neurofilament transport and distinct changes of axonal size. *Brain Res.* 424, 272–280.
- Pompeiano, O., 2006. The vestibulo-ocular and the vestibulospinal reflexes: noradrenergic influences on the plastic changes which affect the cerebellar cortex during vestibular adaptation. *Arch. Ital. Biol.* 144, 197–253.
- Rebert, C.S., Becker, E., 1986. Effects of inhaled carbon disulfide on sensory-evoked potentials of Long-Evans rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 533–41.
- Rolecki, R., Tarkowski, S., 2000. Draft document for carbon disulfide. Lodz Nofer Inst. Occup. Med.
- Salt, A.N., 2004. Acute endolymphatic hydrops generated by exposure of the ear to nontraumatic low-frequency tones. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 5, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s10162-003-4032-z>
- Salt, A.N., Hullar, T.E., 2010. Responses of the ear to low frequency sounds, infrasound and wind turbines. *Hear. Res.* 268, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.06.007>

- Soler-Martín, C., Díez-Padriza, N., Boadas-Vaello, P., Llorens, J., 2007. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 96, 123–132. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl186>
- Song, B.B., Anderson, D.J., Schacht, J., 1997. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 369–377.
- Strume, J.H., 1965. Metabolism of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rats with demonstration of an in-vivo ethanol-induced of inhibition of the glucuronic acid conjugation of the thiol. *Biochem. Pharmacol.* 14, 393–410.
- Sułkowski, W.J., Kowalska, S., Sobczak, Z., Józwiak, Z., 1992. The statokinesiometry in evaluation of the balance system in persons with chronic carbon disulphide intoxication. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health* 5, 265–276.
- Takimoto, Y., Imai, T., Kondo, M., Hanada, Y., Uno, A., Ishida, Y., Kamakura, T., Kitahara, T., Inohara, H., Shimada, S., 2016. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibulo-ocular reflex. *Toxicol. Lett.* 262, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.009>
- Tamura, H., Ohgami, N., Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M., 2012. Chronic Exposure to Low Frequency Noise at Moderate Levels Causes Impaired Balance in Mice. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039807>
- Tham, R., Larsby, B., Eriksson, B., Bunnfors, I., Odkvist, L., Liedgren, C., 1982. Electronystagmographic findings in rats exposed to styrene or toluene. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 93, 107–112.
- Venet, T., Carreres-Pons, M., Chalansonnet, M., Thomas, A., Merlen, L., Nunge, H., Bonfanti, E., Cosnier, F., Llorens, J., Campo, P., 2017. Continuous exposure to low-frequency noise and carbon disulfide: Combined effects on hearing. *Neurotoxicology* 62, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.013>
- Wennmo, C., Henriksson, N.G., Pykkö, I., Schalén, L., 1981. Eye-velocity programming in brain-stem disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 374, 774–783.
- Wood, R.W., 1981. Neurobehavioral toxicity of carbon disulfide. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3, 397–405.
- Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813–828.